

**EXPERIMENTEELE BIJDAGEN
TOT DE KENNIS VAN DE ZOOGENAAMDE
„GEBONDEN SUIKER” VAN HET BLOED**



A. GREVENSTUK THZ.

Amsterdam

EXPERIMENTEEL BIJDRAGEN TOT DE KENNIS
VAN DE ZOOGENAAMDE „GEBONDEN
SUIKER" VAN HET BLOED

EXPERIMENTEEL BIJDRAGEN TOT
DE KENNIS VAN DE ZOOGENAAMDE „GEBONDEN
SUIKER" VAN HET BLOED

ANTOINETTE GREYNSHOF DR.

VERVOLGDE HET ONDERZOEK IN DE
LABORATOIRE VAN DE
NEDERLANDSE RECHTS-
GEWONEN TE AMSTERDAM

TE AMSTERDAM
J. W. DE BUIJT

EXPERIMENTEELE BIJDAGEN TOT DE KENNIS
VAN DE ZOOGENAAMDE „GEBONDEN
SUIKER” VAN HET BLOED

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE
UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, OP
GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS
DR J. C. H. DE MEIJERE, HOOGLEERAAR
IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NA-
TUURKUNDE, IN HET OPENBAAR TE
VERDEDIGEN IN DE AULA DER UNIVER-
SITEIT OP VRIJDAG 21 JUNI 1929,
DES NAMIDDAGS TEN 4½ URE, DOOR

ANTONIE GREVENSTUK THZ.,
ARTS,

BENOEMD HOOGLEERAAR IN DE
PHARMACOLOGIE AAN DE MEDISCHE
HOOGESCHOOL TE WELTEVREDEN,
GEBOREN TE BAAMBRUGGE

EXPERIMENTEEL BIJDAGEN TOT DE KENNIS
VAN DE ZOOGENAAMDE „GEBOEDEN
SUIKER" VAN HET BLOED

ACADEMISCH PROFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE
UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM OP
GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS
D^r J. C. H. DE MEIJERE, HOOGLERAAR
IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NAT.
TOEGEVOEGDE IN HET OPZAKEN TE
AMSTERDAM IN DE ALLE OER-UNIVER.
SITIT OP VRIJDAG 21 JUNI 1899
DES NAMIDDAGS TEN 4 URE DOOR
ANTONIE GREVENSTUK Tsz.

HERENDEEL HOOGLERAAR IN DE
FACULTEIT DER WIS- EN NAT.
TOEGEVOEGDE IN HET OPZAKEN TE
AMSTERDAM

Aan mijn Vrouw

Bij de voltooiing van dit proefschrift is het mij een behoefte, hooggeschatte LAQUEUR, hooggeachte Promotor, U te danken voor het zéér, zéér vele, dat ik in de loop der jaren van U heb mogen leeren, voor Uw leiding en kritischen zin, Uw voorbeeld van onvermoeibaren ijver en gestadige belangstelling, en bovenal voor de groote vrijheid, die Ge mij bij het bewerken van deze dissertatie gelaten hebt. Het moge dan zijn, dat in de naaste toekomst een groote afstand ons scheiden zal en ik op eigen wieken zal moeten drijven, ik hoop ook dan nog menigmaal een beroep om raad en bijstand op U te mogen doen, ja, ik verwacht ook later nog nauwe samenwerking op menig gebied.

Hooggeachte VAN DER WIELEN, aan mijn verblijf als gast op Uw laboratorium bewaar ik nog steeds de aangenaamste herinneringen. Toen ik, teleurgesteld door de medische praktijk, de eerste schreden op het glibberig pad der wetenschap wilde zetten, hebt Ge mij aangemoedigd en met zeldzame welwillendheid geleid: ik zal U daarvoor steeds dankbaar blijven.

Ook U, Mijne Heeren Hoogleeraren der Medische en Wis- en Natuurkundige Faculteiten, van wie ik mijn opleiding tot arts mocht ontvangen, wensch ik mijn dank te betuigen: deze dank geldt ook de velen, die helaas niet meer aanwezig kunnen zijn.

Hooggeleerde WOLFF, Zeergeleerde DINGEMANSE en DE JONGH, nooit klopte ik bij U tevergeefs aan om voorlichting of steun, steeds was onze onderlinge verhouding even vriendschappelijk. Onze samenwerking zal mij steeds in aangename herinnering blijven.

Ook U, overige medewerkers aan het Pharmacotherapeutisch Laboratorium der Universiteit van Amsterdam, van de hoogsten tot de laagsten, van de oudsten tot de jongsten, U allen, zonder uitzondering, dank ik voor de groote medewerking en steun, die ik steeds heb mogen ondervinden, voor den goeden geest, die steeds bewaard bleef en de persoonlijke vriendschap, die ik van menigeen weer mocht ondervinden. Ik hoop van harte, dat deze ook mogen voortduren, wanneer de zeeën ons scheiden zullen.

EERSTE DEEL

LITERATUUROVERZICHT.

A. De chemie van de „gebonden suiker” van het bloed.

Wanneer men van versch, onteiwit bloed het reduceerend vermogen bepaalt, vindt men een zekere waarde.

Kookt men hetzelfde bloed vooraf onder bepaalde voorzorgen met een verdund mineraal zuur en bepaalt na verwijderen van het eiwit en zijn stikstofhoudende afbraakproducten eerst dan het reduceerend vermogen, dan blijkt de thans gevonden waarde hooger.

Dit koken met zuur noemt men *hydrolyse*, omdat de verschillende stoffen onder opname van water gesplitst worden, m.a.w. hydrolyseeren.

Dit feit, dat n.l. door de hydrolyse met zuur het reduceerend vermogen toeneemt, vormt den grondslag voor alles wat in de volgende bladzijden besproken zal worden.

Het eerste bewerkingsproces is in allerlei varianten iederen medicus welbekend en levert als uitkomst de waarden, die men als „het bloedsuikergehalte” aanduidt, zonder evenwel de wetenschappelijke zekerheid te hebben, dat ook inderdaad het geheele waargenomen reduceerend vermogen eenig en alleen op rekening van suiker, en wel in het bijzonder van glucose, komt. Weliswaar zijn er verscheiden aanwijzingen, dat inderdaad glucose althans in hoofdzaak de reductie veroorzaakt, maar ten eerste is de chemische identificatie nog nooit *volledig* uitgevoerd, en ten tweede weet men, dat ernaast een of meer reduceerende componenten voorkomen, die zeker geen glucose

zijn, omdat ze onvergistbaar blijken. Hoe groot deze fractie, de z.g. restreductie, is, is wederom van geval tot geval verschillend, en afhankelijk van diverse, o.a. pathologische, factoren. Op dit alles wil ik evenwel hier ter plaatse niet nader ingaan; den belangstellenden lezer verwijs ik naar een andere publicatie van mijn hand (53), die ongeveer gelijktijdig met deze dissertatie verschijnt en waarin al deze punten onderwerp van uitvoerige bespreking vormen.

Daarentegen wensch ik voor het tweede der zooeven genoemde feiten, de *toename* van het reduceerend vermogen van bloed of orgaanextracten door stelselmatige hydrolyse volgens vaste regelen met een verdund mineraal zuur, de volle aandacht te vragen. Deze waarde bepaalt men dus, door het reductievermogen zoowel voor als na de hydrolyse vast te stellen, en dan eerstgenoemd cijfer van het laatste af te trekken: het verschil tusschen beide is dan de genoemde toename. Deze heeft men al voor vele jaren eveneens, zij het ook zonder veel bewijs, op rekening van — in dit geval aanvankelijk gebonden, maar door het zuur in vrijheid gestelde — suiker (glucose) geschreven. Ja, men is in zijn hypothesen nog verder gegaan en meende ook te mogen veronderstellen, aan welke stof deze suiker tevoren gebonden was, en wel aan eiwit: vandaar de naam „eiwitsuiker”, „protein sugar” (PAVY), „sucre protéidique” (BIERRY C.S.) die door sommigen al naar hun inzichten nog ter nadere aanduiding omgezet werd in glycoglobuline (CONDORELLI), glycopepton, glycoalbumose etc. Overtuigend zijn de argumenten, die de verschillende schrijvers voor hun zienswijze aangevoerd hebben, echter geen van allen: straks zullen wij hier nog even nader op ingaan.

Onze belangstelling voor dit weinig bekende gebied der physiologische chemie was gewekt in een vroegere periode van ons experimenteel en literair werk, toen het insuline nog in het centrum van ons interesse stond. Bij het bestudeeren van de werkingswijze van dit hormoon doet zich n.l. de vraag voor, wat geschiedt met de vrije suiker, die blijkens de constant

optredende, karakteristieke verlaging van het vrije-bloed-suikergehalte, uit de circulatie verdwijnt. Mogelijk was het, dat ze verbrandde, en evenzoo, dat ze zonder oxydatie in een of meer niet- of althans minder-reduceerende derivaten omgezet werd. Maar daarnaast kwam nog een derde mogelijkheid in aanmerking, en wel deze, dat ze als „vrije suiker” verdween, hetzij door polymerisatie tot glycogeen, hetzij door binding aan andere complexen. Toen dan ook de Roemeensche onderzoekers NITZESCU en POPESCU—INOTESTI (89) mededeelden, bij honden vastgesteld hebben, dat, naarmate de vrije bloed-suiker onder invloed van het insuline daalde, de gebonden suiker in (zij het ook iets mindere) mate steeg, hebben wij onze volle aandacht op dit punt gevestigd. Daarbij bleek al spoedig hoe oneindig groote verwarring heerschte in de opvattingen der verschillende onderzoekers, die zich al met de „gebonden suiker” onder een of anderen naam beziggehouden hadden, en daarenboven, hoe elk behoorlijk samenvattend overzicht van de desbetreffende literatuur ontbrak. Dus stelde ik mij allereerst tot taak, zooveel mogelijk gegevens uit de literatuur te verzamelen, deze te ordenen en te schiften, en aldus te trachten, een inzicht te verkrijgen. Het resultaat was een verzameling van ongeveer vijfhonderd artikelen, sommige van een omvang van slechts enkele regels, andere daarentegen gansche boek-deelen vormend, maar bijna zonder uitzondering eenzijdig en van vooropgezette meeningen uitgaande. Om deze kritisch te kunnen rangschikken, was meer ruimte noodig dan een dissertatie in den regel biedt. Daarom heb ik dit literatuuroverzicht afzonderlijk verwerkt en in Asher-Spiro's *Ergebnisse der Physiologie* doen opnemen (53); alleen een korte samenvatting der uitkomsten moge hier opgenomen worden, als inleiding tot het tweede deel, dat over mijn eigen proefnemingen handelt.

Allereerst moge dan in 't kort de vraag besproken worden, in hoeverre men erin geslaagd is, aan te toonen, dat de stof, die door de hydrolyse afgesplitst wordt, inderdaad glucose is. De meest volledige pogingen tot identificatie zijn gedaan door

BIERRY en Mme RANDOIN—FANDARD (5, 101 pag. 187), twee auteurs, die zich voor de kennis van het gedrag der ons hier bezighoudende stoffen in het dierlijk lichaam buitengewoon verdienstelijk gemaakt hebben. Maar ook hun vonden geven slechts hoogstens een aanwijzing in de richting der glucose, en geenszins zekerheid. Immers noch 't feit, dat de bedoelde stof de oplossing van Fehling in de warmte krachtig reduceerde, noch de waarneming, dat ze met phenylhydrazine in de warmte vrijwel met phenylglucosazon overeenkomende kristallen leverde, noch zelfs de gebleken vergistbaarheid leveren daarvoor het absolute bewijs; het feit dat de stof uit haar alcoholische oplossing door aether neergeslagen werd, nog minder. En rechtstreeks daartegen pleit, dat de onderzochte oplossing optisch linksdraaiend was, al werd na zeer vaak herhaald zuiveren dan ook ten slotte nog een zwak rechtsdraaiende vloeistof verkregen. Ook bij een herhaling van het onderzoek verkreeg BIERRY (4) naderhand analoge uitkomsten.

Gaan wij nu na, welke reduceerende stoffen, die aan ongeveer dezelfde voorwaarden voldoen, naast glucose mogelijkerwijs nog in gebonden vorm in het bloed zouden kunnen voorkomen, dan blijken dit er nog vele te zijn: ten eerste de isomere hexosen: fructose, mannose en galactose, ook wellicht pentosen, de triosen dioxyaceton en glycerinaldehyd, de aminosuikers chitosamine (glucosamine), isoglucosamine en chondrosamine, wellicht ook pentosaminen, tenslotte het zoo moeilijk volledig identificeerbare glycuronzuur, isoglycuronzuur, misschien zelfs allerlei aldehyden. Bovendien bestaat bij onze zeer onvolledige kennis der elementaire samenstelling van de ons bezighoudende substantie nog de kans, dat haar reduceerend vermogen niet berust op de aanwezigheid van $=O$, maar van $=S$, dat voorkomt in een groep van stoffen, waarvan steeds meer vertegenwoordigers in het lichaam ontdekt worden (cysteïne, glutathion, ergothioneïne).

Nu heeft men weliswaar op grond van diverse waarnemingen gemeend de aanwezigheid van verschillende dezer stoffen en wel speciaal van de laatstgenoemde groep in het bloedhydroly-

saat, mits dit behoorlijk onteiwit was, te kunnen uitsluiten, maar desondanks is de keuze nog geenszins tot glucose alleen beperkt. Wij komen hierop nog terug.

Nemen wij voorshands als vaststaande aan, dat inderdaad glucose de gebonden reduceerende stof is, dan rijst de vraag, aan welke stof of stoffen deze dan wel gekoppeld mag zijn. Ook hier doen zich dan weer tal van mogelijkheden voor: ten eerste kan de glucose zich met zichzelf of zijn isomeren condenseeren tot biosen en polysacchariden; voorts bestaat de door velen geopperde bindingsmogelijkheid aan eiwitten en eiwitderivaten, tot de eenvoudigste aminozuren toe, en aan vetzuren en lipoiden, tenslotte aan de aminohexosen en aminopentosen, en aan phosphaat. Verder moet men zich ook herinneren, dat de niet-reduceerende suiker-anhydriden, laevoglucosan b.v., door behandeling met verdund zuur weer water opnemen en in de overeenkomstige reduceerende suiker overgaan.

Elk van deze mogelijkheden is belangrijk genoeg om er hier enkele woorden aan te wijden: voor een uitvoerig overzicht moge weer naar de tegelijk verschijnende Duitsche publicatie verwezen worden.

Allereerst dan de binding aan *eiwit* of eiwitderivaten: PAVY als eerste (93 t'm 98) heeft den naam „protein sugar” voorgesteld, later gevolgd door LÉPINE (77), en BIERRY (7) met hun „sucre protéidique”. Als motiveering diende, dat zij bij hydrolyse van uit bloed bereid fibrinogeen, serumglobuline of serumalbumine steeds een toename van het reduceerend vermogen zagen optreden. Deze waarneming was ongetwijfeld juist, maar wanneer men met kritisch oog de proefnemingen zelve beschouwt, mag men er zich toch niet door laten overtuigen. Immers: de wijze waarop zij de afgescheiden eiwitfracties van verontreinigingen trachtten te zuiveren, was absoluut onvoldoende; bovendien hebben zij bij de identificatie van het verkregen reduceerende splitsingsproduct als glucose de quantitative wanverhouding tusschen het groote reduceerende vermogen en de minimale hoeveelheid phenyl-

osazon ten eenenmale uit het oog verloren. Dat verder volgens hen onteiwit bloed geen afsplitsbare reduceerende stof meer zou bevatten, is ten eerste in zijn algemeenheid onjuist, zooals o.a. PAVY zelf reeds vond, en ten tweede bewijst het ook in die gevallen, waar het wel juist is, daarom niets, omdat wij weten, dat een eiwitneerslag, hoe ook verwekt, steeds andere niet-eiwitachtige colloïdale en zelfs niet-colloïdale stoffen aan zich hecht en meêsleepst.

Maar er is nog meer. In het bijzonder in de zeer nauwkeurige proeven van LANGSTEIN, die met steeds beter techniek genomen werden (61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69) bleek, dat, hoe zorgvuldiger het eiwit fysisch gezuiverd werd, voordat het aan de hydrolyse met zuur werd onderworpen, de opbrengst aan reduceerend materiaal steeds daalde, tot sporen toe. Dit pleit er zeker niet voor, dat de suiker, zoo het al glucose is, in het chemisch verband van het eiwit-molecuul zou zijn opgenomen. Dat er echter een of andere fysische binding zou bestaan, kan men niet uitsluiten, gegeven het door CONDORELLI (25, 26) ontdekte feit, dat, wanneer men uit bloedplasma de globuline-fractie met ammonium-sulfaat uitzout, speciaal hierin verreweg het grootste deel der afsplitsbare reduceerende stoffen aanwezig is.

Wat de waarschijnlijkheid betreft, dat de glucose aan *eiwitaafbraakproducten* gebonden in het bloed zou circuleeren, groot is deze m.i. niet. Toch kan men de mogelijkheid van dergelijke combinaties niet ontkennen: in de organische chemie kent men b.v. verbindingen van ureum en van verschillende aminozuren met allerhande suikers, ja, bij de laatste groep valt zelfs de gretigheid op, waarmede ze samen in dergelijke binding treden.

Binding van glucosemoleculen onder elkaar of met moleculen van andere suikers, m.a.w. de vorming van *polymere koolhydraten*, zal men met meer reden mogen verwachten, gegeven de bekende aanwezigheid van glycogeen in allerlei organen. En inderdaad heeft men gemeend, in het bloed zoowel maltose als isomaltose, lactose, dextrinen en glycogeen

te kunnen aantonen. Ook hier echter zijn de hoeveelheden, zoo ze al inderdaad aanwezig zijn, zoo gering, dat tot dusverre van een werkelijk volledige chemische identificatie bij geen van allen sprake geweest is. Ik meen dus met de vermelding alleen te kunnen volstaan.

De mogelijkheid van condensatie van glucose met *vetten en vetderivaten* dienen wij eveneens te noemen. Koolhydraat-esters van hogere vetzuren zijn chemisch allang bekend, maar tot dusver heeft nog nagenoeg niemand zich afgevraagd, of hun ook een rol in de stofwisseling toebedeeld kon zijn, wat des te meer opvalt, in aanmerking nemende onze gebrek-kige kennis van den onderlingen samenhang tusschen koolhydraat- en vetstofwisseling, die blijkens de dagelijksche ervaring toch zeker bestaat en zelfs een der gewichtigste correlaties van het geheele dierlijk organisme moet zijn. Ook zou men zich kunnen denken dat de verbindende schakel over lagere derivaten der vetten liep, b.v. over de verbindingen van glucose met aceton, zooals LAQUEUR en ik (54) indertijd opperden. Weliswaar hebben de naar aanleiding van deze hypothese genomen proeven van MARTENS (84) haar niet kunnen steunen, maar ten eerste bestaat de kans, dat daarbij de omstandigheden te veel van de physiologische afweken, ten tweede is het mogelijk, dat onze greep onjuist was en het beter geweest zou zijn, een ander vetderivaat dan juist aceton te kiezen. En ten slotte zou het nog kunnen zijn, dat niet de verbinding tusschen koolhydraat en vetzuur een directe is, maar dat andere atoomgroepen als schakel dienst doen. Daarop komen wij aanstonds nog terug.

Dat hexosen met *phosphaten* in het lichaam in verbinding treden, weten wij met zekerheid sedert de baanbrekende onderzoeken van EMBDEN en zijn medewerkers aangaande de actie der spieren en het daarbij een zoo gewichtige rol vervullende lactacidogeen. Het is dus geenszins uitgesloten te achten, dat dergelijke hexosephosphaten ook in het bloed circuleeren, en inderdaad meenen enkele onderzoekers [LAWAC-

ZECK (71, 72), GOODWIN & ROBISON (52) e.a.], een of meer hexosephosphaten daarin aangetoond te hebben. Hoe interessant overigens deze vondst ook moge zijn, voor het ons bezighoudende probleem is ze maar van zeer beperkte waarde, daar bleek, dat de aldus gebonden hoeveelheid glucose in het bloed slechts één honderdste bedraagt van de hoeveelheid „vrije bloedsuiker”, terwijl de „gebonden suiker”-waarden, zooals men die bij normale individuen aantreft, vaak 50 % of meer van het vrije suikergehalte beloopten.

Een stap verder gaande, komen wij nog tot de zoeven reeds genoemde mogelijkheid der indirecte *binding van glucose en vetzuren door middel van andere atoomgroepen*, en het blijkt, dat dan opnieuw het fosphaat, thans niet als terminale groep, maar als tusschenschakel, een rol zou kunnen vervullen. Immers het *jecorine*, een stof, of beter gezegd een groep van stoffen, waaraan men veertig jaar geleden vooral zijn aandacht schonk, zou volgens de toenmalige meening lecithine-glucose zijn, en dus bestaan uit glucose, fosphaat, een vetzuur en choline. Zonderlingerwijze is het experimenteele onderzoek van de genoemde stof of stoffen allengs doodgeloopen zonder tot een definitieve afsluiting gekomen te zijn. Het moge waar zijn, dat ze waarschijnlijk meer 't eindproduct van een uniforme bereidingswijze dan wel chemische individuen waren, het schijnt op zijn minst voorbarig, schrijftafelbespiegelingen aangaande hun structuur, (b.v. de aanwezigheid van kephaline in plaats van het lecithine) te verkondigen, zooals b.v. MACLEAN voor enkele jaren in een overigens fraaie monografie (83) nog deed. Alleen exact onderzoek, getoetst aan grondige moderne chemische kennis, zal ons hier den uitweg uit den doolhof kunnen wijzen.

Boven was reeds, zoowel bij de binding van glucose aan vetderivaten als bij die van glucose aan lecithine, bij herhaling sprake van hogere vetzuren, die dan ook b.v. bij het *jecorine* meermalen als stearinezuur geïdentificeerd zijn. Nu moge er hier met een enkel woord op gewezen worden, dat juist in de laatste jaren de aanwezigheid in gebonden vorm

van het overeenkomstige aldehyd: stearinaldehyd, en ook palmitinaldehyd, zoowel in bloed als in organen, onderwerp is geweest van een aantal buitengewoon interessante onderzoekingen van FEULGEN en zijne medewerkers (41, 42, 43, 56, 57, 58, 106). Zij noemden de gezamenlijke aldehyden in den aanvang van hun onderzoek *plasmal*, en den complexen vorm, waarin dit plasmal in vivo uitsluitend voorkomt en waaruit het merkwaardigerwijze door de karakteristieke inwerking van waterige sublimaatoplossingen in de koude (maar ook door verdund mineraal zuur) reeds wordt afgesplitst: *plasmalogueen*. Afgezien van de vraag, waaraan nu deze aldehyden wel gebonden geweest mogen zijn, moet ons dit in verband met het jecorine-probleem ook daarom interesseeren, dat deze aldehyden zich bij verwerking aan de lucht uiterst gemakkelijk oxydeeren (dus reduceerende werking bezitten!) tot het overeenkomstige zuur, wat dus de identificatie van stearinezuur in de jecorine-hydrolysaten zou kunnen verklaren.

Tot zooverre dus, voor wat de eventueele bindingsmogelijkheden der glucose aangaat. Met het oog evenwel op den gerechtvaardigden twijfel, of men wel inderdaad alleen met dit koolhydraat te doen heeft, moeten wij ook de overige in aanmerking komende suikers en aminosuikers de revue laten passeeren.

Allereerst dan de *fructose*: gemakkelijk is het vaak niet, uit te maken, of in een bepaald geval de aanwezige suiker glucose of fructose is: zoo bestaan er b.v. sterke vermoedens, dat in de reeds genoemde hexosephosphaten geen glucose, maar fructose aanwezig is. Een definitieve beslissing kon nog slechts zelden gebracht worden: overigens zijn op het ons hier interesseerende terrein nog geen speciale fructose-derivaten bekend geworden.

Vervolgens de *mannose*: aan de aanwezigheid van deze hexose in de hydrolysaten hebben reeds meerdere onderzoekers gedacht, zoodat zij ook pogingen deden, met behulp van phenylhydrazine in de koude het zoo karakteristieke

mannose-phenylhydrazon eruit te bereiden. Aanvankelijk slaagden deze pogingen niet (BIERRY 4): voor kort echter gelukte het DISCHE (39) inderdaad, uit paardenplasma-hydrolysaten d.-mannose in ruime hoeveelheid als hydrazon te isoleeren. Hiermede is het vraagstuk van de „gebonden suiker” een aanzienlijken stap nader tot zijn oplossing gekomen, al hebben wij omtrent de quantitatieve verhoudingen nog geen inzicht, en weten wij ook nog niets omtrent de stof, waaruit het afgesplitst is. Was dit misschien ook chitosamino-mannose, zooals FRÄNKEL & JELLINEK (45) in eier-albumine voor kort aantreffen, of althans een analoge verbinding?

De vierde hexose, die voor korte beschouwing in aanmerking komt, is de *galactose*, en wel in het bijzonder, omdat wij weten, dat deze in het zenuwstelsel in de als „cerebrosiden” en „protagon” bekende mengsels gebonden in belangrijke hoeveelheid voorkomt. Later heeft men de aanwezigheid van deze chemisch grondig bekende galactose-houdende lipoiden, de galactolipinen (pendanten van het hypothetische glucolipine jecorine dus), in allerlei andere organen kunnen vaststellen. Volgens de oudere onderzoekingen van BANG & FORSMANN (1) en PASCUCCI (92) zouden ze ook in het bloed voorkomen; omtrent de quantitatieve verhoudingen is echter niets bekend.

Van aminohexosen (die echter allicht door het onteiwittend agens mede neergeslagen en verwijderd worden) vallen glucosamine (chitosamine), isoglucosamine en chondrosamine binnen onzen gezichtskring. Hiervan vallen beide laatst genoemde echter al terstond af: het isoglucosamine omdat er bijna niets van bekend is, het chondrosamine, omdat het alleen in kraakbeen e.d. voorkomt. Van *glucosamine* daarentegen weten wij met zekerheid, dat het in gebonden vorm regelmatig in het bloed voorkomt, en wel in het serummucoïd, tezamen met glycuronzuur. Gebruikt men voor het verwijderen van het eiwit phosphorwolframaat, dat glucosamine niet neerslaat (NEEDHAM 87), dan moet het laatstgenoemde in de filtraten aan te toonen zijn, terwijl na gebruik van kwikzouten

te verwachten is, dat men niets vindt: dit laatste is volgens de waarnemingen van BIERRY en RANDOIN—FANDARD (101 pag. 189) inderdaad het geval.

Als laatste reduceerend glucosederivaat moeten wij het zoo-even reeds genoemde *glycuronzuur* bespreken, dat even constant als het glucosamine in gebonden vorm in het bloed aanwezig is, en wel eveneens in het serummucoïd. Voorts weten wij, dat tal van vergiften aan glycuronzuur gepaard met de urine uitgescheiden worden: tenzij deze paring in de nier zelve plaats vindt, zal men mogen verwachten, dat ook dergelijke gepaarde glycuronzuren in het bloed circuleeren. Over de quantitative verhoudingen weten wij echter wederom niets; de bepaling daarvan wordt nog bemoeilijkt door het feit, dat bij eenigermate krachtige hydrolyse, b.v. met verdund zwavelzuur, het glycuronzuur gedestruëerd wordt.

Ook *pentosen* moet men in het bloed verwachten, zooal niet in het plasma, dan toch in de cellen, en wel in het bijzonder in de kernen van leuco- en lymphocyten; inderdaad meende JACKSON (59) de aanwezigheid van nucleotiden in het bloed te kunnen aantoonen. Welke pentosen echter hierbij in 't spel zijn, is nog volkomen onbekend, evenals de hoeveelheid, waarin zij voorkomen.

Polymere Pentosaminen en wel dipentosamine, meent men tot dusverre alleen in de lever aangetroffen te hebben, evenals het acetyl derivaat daarvan (OFFER 90). Mochten ze al in het bloed voorkomen, dan moet ook hier ten volle het boven voor glucosamine gezegde gelden.

Ten slotte dienen wij nog de triosen *glycerinaldehyd* en *dioxyaceton* te bespreken, en wel in het bijzonder omdat door FISCHLER c.s. (44), MACLEAN (73) e.a. steeds meer de nadruk gelegd wordt op de belangrijke rol, die deze eenvoudige stoffen in het lichaam bij de koolhydraatstofwisseling zouden spelen. Terecht echter wijzen FISCHLER & HIRSCH (l.c.) erop, dat men bij zoo reactieve stoffen allerminst zal mogen verwachten, dat ze *vrij* in het bloed circuleeren, maar

dat ze zich zoo spoedig mogelijk aan andere bloedbestanddeelen zullen binden. Hetzelfde geldt voor hun anhydried, het *methylglyoxaal*. Hier moet evenwel vermeld worden, dat dit alles tot dusverre nog een — zij het dan ook op grond van allerlei waarnemingen langzamerhand vrij waarschijnlijk geworden — hypothese is. Gebonden triosen kent men echter chemisch reeds, b.v. het dioxycetonphosphaat (RABINOWITCH 100), en ook condensatieproducten van methylglyoxaal met aminozuren (NEUBERG & KOBEL 88).

Eigenlijk behoorde op deze plaats ook een bespreking der glycolyse, maar waar deze voornamelijk als afstervings-verschijnsel in vitro bestudeerd is en door de buitengewone ingewikkeldheid van het probleem stof genoeg voor een gansche dissertatie levert, geloof ik, hier van verdere bespreking te mogen afzien en naar de uitvoerige discussie in mijn meergenoemde Duitsche publicatie (53) te mogen verwijzen.

Kort moge alleen nog LÉPINE'S „*sucre virtuel*” besproken worden, daar men dezen naam nog wel eens ter aanduiding van de „gebonden suiker” in haar geheel in de literatuur ontmoet. Daarbij dient evenwel meteen vermeld, dat ze daaruit in haar algemeenen zin liefst zoo spoedig mogelijk verdwijnen moest, daar LÉPINE zelf er achtereenvolgens minstens drie volkomen verschillende definities van gegeven heeft, die geheel uiteenlopende groepen van stoffen omvatten (80; 76; 74 p. 56, 75).

Alleen voor de in zijn laatst (1913) gepubliceerde definitie bedoelde stoffen moge de naam behouden blijven: de „*sucre virtuel*” zou dan uitsluitend omvatten de *door fermenten afsplitsbare* suiker. Het was hem n.l. gebleken, dat onder inwerking van emulsine of invertase, maar ook onder den invloed van de in een maceraat der conidiën van *Aspergillus niger* aanwezige fermenten, ja zelfs door een extract van bloedvaatwanden, tevoren gebonden reduceerend materiaal in vrijheid gesteld werd. Van alle kanten zijn deze waarnemingen betwist, tot evenwel onlangs GABBE het belangrijke probleem

tot nieuw leven gewekt heeft door aan te toonen, dat, mits men zijn proefcondities nauwkeurig kiest, de uitkomsten van LÉPINE inderdaad reproduceerbaar zijn (47 t/m 50). Ook TAKA-diastrase bleek tot dezelfde splitsingen in staat. Van gewicht is bovendien, dat volgens GABBE's vonden de splitsbare stof vrijwel uitsluitend in de roode bloedlichaampjes voorkomt, terwijl anderen (LAWACZECK 71, 72) ditzelfde voor de hexosephosphaten vastgesteld hadden; bovendien weet men, dat emulsine hexosephosphaat kan splitsen (ROBISON c.s. 52). De gevolgtrekking ligt dus voor de hand, dat sucre virtueel en hexosephosphaat althans ten deele identiek zouden zijn: wederom een gewichtige aanwijzing. Quantitatief onderzoek ad hoc zal echter ook hier den doorslag moeten geven.

Vatten wij den totaalindruk omtrent den chemischen aard van de „gebonden suiker” van het bloed samen, dan kunnen wij zeggen, dat de reduceerende component inderdaad waarschijnlijk uit een of meer koolhydraten bestaat, maar wellicht daarnaast ook nog reduceerende stoffen van anderen aard, als aldehyden e.d. bevat. Bij deze onzekerheid spreekt het vanzelf dat men aangaande den aard van de complexe verbinding (-en) van deze stoffen nog veel meer in het duister tast: met name is het nog volslagen onbekend, welke stof de hoofdrol speelt. Toekomstig onderzoek zal hier opheldering moeten geven. In afwachting daarvan stel ik voor, de geheele zoogenaamde „gebonden suiker” aan te duiden als

Hy—S

(als internationaal bruikbare en begrijpelijke afkorting voor „bij zure hydrolyse een reduceerend product leverende stoffen” „hydrolysierbare Substanzen”, „hydrolysable substances” enz.) Dan praëjudicieert men tevens niets onbewezens omtrent den waren aard van deze stof(fen), nog afgezien van de ruimtesbesparing.

De keuze van een symbool was hier moeilijk, en bij menig een zal onze Hy-S associaties met hysterie tevoorschijn roepen: niet geheel ten onrechte, want in haar Proteus-natuur vertoonen beide begrippen groote overeenkomst!

B. De physiologie van de „gebonden suiker” van het bloed.

Het physiologisch gedrag van de Hy-S van het bloed, en speciaal van het plasma, dat regelmatigere uitkomsten zou geven, is, voor wat zijn quantitatieve veranderingen betreft, reeds herhaaldelijk nagegaan, en men moet zeggen, dat deze onderzoekingen tot dusver met meer succes bekroond zijn dan die betreffende haar chemische natuur. In dit verband moet men vooral de namen van BIERRY en zijn medewerkster RANDOIN-FANDARD (101), LÉPINE (74), van de Engelschen PAVY (93 t/m 98) en CAMMIDGE (23) en van CONDORELLI en zijn vele Italiaansche medewerkers noemen. Wel pasten zij allen verschillende verwerkings-methoden toe, welker resultaten zonder twijfel niet direct onder elkaar vergelijkbaar zijn, maar gelukkigerwijze deed haast ieder ook de noodige contrôlebepalingen, zoodat men op verschillende punten toch reeds tot een bevredigende overeenstemming gekomen is. Zonder in finesses te vervallen (ook deze kan men in mijn meergenoemde Duitsche publicatie vinden) wil ik hier alleen een opsomming van de hoofdzaken geven.

Ten eerste zou onder gelijke uitwendige omstandigheden een bepaald individu in zijn bloed een nagenoeg constant Hy-S-gehalte hebben (RANDOIN 101 p. 249). Vervolgens zouden alle individuen van een bepaalde species onder gelijke omstandigheden nagenoeg hetzelfde Hy-S-gehalte bezitten, en wel aldus, dat die soorten, die de hoogste lichaamstemperatuur vertoonen en het hoogst in de phylogenetische reeks geplaatst zijn, de laagste Hy-S-waarden hebben, en omgekeerd.

Omtrent het quantitatieve gedrag van de Hy-S in de verschillende vaatgebieden van een en hetzelfde individu bestaan nog zoo tegenstrijdige meeningen, dat wij daarop niet nader behoeven in te gaan: alleen vermelden wij, dat zoowel BIERRY & RATHERY (9) als CONTI (37) onder bepaalde omstandigheden vonden, dat het plasma der Venae hepaticae veel minder Hy-S bevatte dan dat der V.portae, wat er dus op wijzen zou,

dat de lever in de stofwisseling van de Hy-S een rol van gewicht vervult.

Dient men een individu glucose toe, hetzij per os of intraveneus, dan volgt, even regelmatig als de bekende stijging van het vrije bloedsuikergehalte, maar later, ook een stijging van het Hy-S-gehalte van het bloed, zij het ook dat deze gewoonlijk niet zoo groote uitslagen vertoont als het vrijsuiker-gehalte, en vaak zelfs door een aanvankelijke daling voorafgegaan wordt [CONDORELLI (25, 28, 32, 33, 35), BRUGI (18), CAMMIDGE & HOWARD (23), BORDET (16)].

De pathologie van de „gebonden suiker” van het bloed.

Klinische onderzoekingen hebben aangetoond, dat bij tal van ziekten het gehalte van het bloed aan Hy-S (daargelaten of deze ook dan identiek is met de normaal voorhandene) karakteristieke wijzigingen vertoont, nu eens in den vorm van stijging, dan weer als daling. Ook hier weer zijn reeds zoovele onderzoekingen gedaan, dat het mij te ver zou voeren, deze alle hier een voor een te bespreken. Men kan de uitkomsten echter aldus samenvatten:

1. *Verlaging* van het Hy-S-gehalte komt vrij zelden voor, en is tot dusver alleen waargenomen bij bepaalde gevallen van leverziekte en ongecompliceerden diabetes [CONDORELLI (28, 29, 30, 34), CALTABIANO (19, 20), RAPISARDI (102)]. De later te bespreken kortdurende hydrolysemethode van CONDORELLI schijnt hier het duidelijkst het afwijkende gedrag aan te toonen.
2. *Stijging* van het Hy-S-gehalte wordt constant waargenomen bij *carcinoom* [FREUND, TRINKLER, SPENCE (46, 60), CONDORELLI (30, 31), BIERRY, RATHERY & LEVINA (13)], bij gevorderde *tuberculose* [BRUGI (18), CONDORELLI (31, 32), CALTABIANO (19), BORDET (16)] en bij *uraemie* [BORDET (16), PALOMBELLA (91)], in het algemeen dus bij een aantal troosteloze ziektoestanden, waartegen de therapie tot dusverre vrijwel machteloos staat. In hoeverre men deze

vermeerdering als symptomatisch of als causaal moet beschouwen, daarover weten wij niet het minste. Wel vond BORDET reeds, dat bij uraemische nephritici, wanneer de toestand verergert, 't Hy-S-gehalte stijgt; daarentegen treedt een daling op, wanneer onder invloed der therapie de toestand verbetert. Ook het hoge Hy-S-gehalte bij carcinoom schijnt men te kunnen beïnvloeden: CONDORELLI nam althans waar (35), dat na toediening van 20 gram glucose per os of intraveneus een voorbijgaande sterke daling optrad. Of, en in hoeverre ook een medicamenteuse beïnvloeding van het gehalte in deze gevallen mogelijk is, en welk effect dit heeft op het ziekte-proces, daarvan weten wij nog niets. Toch bestaat de mogelijkheid, dat aldus iets te bereiken zou zijn, immers ook het carcinoomweefsel zelf vertoont een bovenmatig groot gehalte aan dergelijke Hy-S die toch geen glycogeen is (FREUND, KAMINER 46, 60), zoodat men wel mag veronderstellen, dat ze een essentieel bestanddeel van het tumorcellichaam uitmaakt. Is het nu mogelijk, door medicamenteuse verlaging van het Hy-S-gehalte in het bloed den tumor zoodanig in zijn voedingstoestand te verzwakken, dat hij den strijd tegen de afweerkrachten van het organisme verliest? Dat zal de toekomst moeten leeren.

De experimenteele beïnvloeding van het „gebonden suikergehalte”.

Onder dit hoofd willen wij allereerst het effect van eenige operatieve ingrepen vermelden. Ten eerste dan de experimenteele diabetes door pancreasexstirpatie: zonderlingewijze schijnen de waarnemingen hierbij meer uiteen te loopen dan bij den klinischen vorm. Afbinden van den Ductus Wirsungianus bewerkt vgl. LÉPINE (75, 78) een verhooging van 't Hy-S-gehalte, evenzoo afbinding der ureteren (BIERRY, RATHERY, BORDET 11, 16, MORITA 85), zoodra de proefdieren uraemisch worden. Voorts meent men, hetzelfde waargenomen te hebben na *vagusprikkeling* (CAMMIDGE 22, 23), *hersenen-*

schudding (LÉPINE 74), *Röntgenbestraling* (LÉPINE 74), *verhoging der lichaamstemperatuur* door heete baden (CONDORELLI 25) of verblijf in een broedstoof (LÉPINE 81); wisselend zou het effect zijn van *bloedverlies* (BORDET 16, RANDOIN 101, LÉPINE c.s. 75, 78), terwijl sterke daling bewerkt zou worden door *afkoeling* (koude baden) (CONDORELLI 25, BIERRY & RANC 8), *vasten* (LÉPINE c.s. 76) en bovenal in zeer sterke mate door *punctie van den 4en ventrikel* (suikersteek) (CONDORELLI 25, 27).

Voorts is ook de mogelijkheid gebleken, het Hy-S-gehalte door toediening van pharmaca te beïnvloeden. Er bestaan echter merkwaardig tegenstrijdige opgaven aangaande het effect van één en dezelfde stof. Blijkbaar schuilt de oorzaak daarvoor ten deele in onzuiverheid der toegediende middelen; de hoofdzaak zal echter wel zijn, dat de eene onderzoeker zijn bepalingen eerder of later verrichtte dan de andere, en maar zelden voldoende frequente seriebepalingen uitvoerde, mede door de te geringe bekendheid van voldoende scherpe micromethoden. Ik zal dus met een korte opsomming trachten te volstaan: een volledige discussie vindt men wederom in mijn Duitsche publicatie ter zake.

Mede in verband met de boven reeds besproken therapeutische perspectieven komen in de allereerste plaats die agentia aan de orde, die een *verlaging* van het Hy-S-gehalte zouden bewerken. Als zoodanig vindt men opgegeven: ten eerste het *insuline* (SIMONNET & RANDOIN 104, STAUB 105 p. 53, TOSCANO 108), en ook *ruwe pancreasextracten* (CAMMIDGE & HOWARD 23 p. 110); voorts *adrenaline* (CONDORELLI 25, 32, 33, BRUGI 18, PHOCAS 99), althans in de eerste phase van zijn werking (BIERRY c.s. 10, 13, 14, TOSCANO 108). Merkwaardig is een proef van laatstgenoemde, waar insuline, met adrenaline samen gegeven, een ongeveer 5 uur aanhoudende diepe daling bewerkte, dieper en bovenal veel langduriger dan die welke de componenten elk voor zich verwekten.

Pituitrine zou volgens CONDORELLI (32, 33) en BRUGI (18) $\pm$ 30 à 45 minuten na de injectie een vluchtige daling van de

Hy-S bewerken. Verdere agentia, welke met eenige zekerheid een daling schijnen te veroorzaken, zijn *histamine* en *pepton* (CHAHOVITCH c.s. 24), *aether* (CONTI 37), *diphtherietoxine* (BORDET 16)..

Stijging van het Hy-S-gehalte vindt men opgegeven als karakteristiek gevolg van de inwerking van *insuline* (dat wij n.b. zooeven reeds bij de daling verwekkende agentia ontmoetten!) door een groot aantal onderzoekers: NITZESCU & POPESCU—INOTESTI (89), BIERRY, RATHERY & KOURILSKY (12) SCOTT & BEST (103), CONDORELLI (28, 34), BISCEGLIE (15), BUFANO (36), CARRA (36), CALTABIANO (51), LIOTTA (51), CAMMIDGE (21), GABBE (49). Straks kom ik op deze opvallende controverse nog bij de bespreking van mijn eigen proeven terug, en wil nog alleen vermelden dat insuline, tegelijk met zijn overig therapeutisch effect, ook de bij sommige diabetesgevallen verlaagde Hy-S-waarden weer tot de norm terugbrengt [BIERRY, RATHERY & KOURILSKY (12), BUFANO (36), CARRA (36), CALTABIANO (51), LIOTTA (51)].

Verder vindt men nog een gansche reeks van stijging-verwekkende agentia vermeld: *extracten van thyreoidea*, *hypophyse*, *bijnier* (FORSYTH 23) en *lever* (LÉPINE 79), voorts *secretine* (CAMMIDGE 23 p. 197), *asphyctisch bloed* (LÉPINE 79), *eiwit* (anaphylactische shock) (la BARRE 2), *amylase* (LÉPINE & BOULUD 79), *phytokinine* (een plantaardig insulinesurrogaat) (CONDORELLI 27), *narcotica* (PAVY 93), *koolmonoxyd* (PAVY 93), *antipyrine* (LÉPINE 75), *lood- en kwikzouten* (LÉPINE 75), *zuren* (CAMMIDGE 23 p. 197), *morphine*, *hyoscine*, *veratrine* (LÉPINE & BOULUD 75), *phloretine* (CAMMIDGE 23), *phlorhizine* (LÉPINE & BOULUD 74, 75, 79), *hydrazinesulfaat* (CAMMIDGE 22, 23). Een uitgebreider bespreking van al deze schijnt mij te dezer plaatse overbodig. Zooals wij in een der vorige hoofdstukken zagen, komt voor zoover wij weten pathologische verlaging van het Hy-S-gehalte behalve bij diabetes slechts zoo zelden voor, dat nauwelijks te verwachten is, dat andere verhoogende agentia dan het insuline ooit een belangrijke therapeutische rol zullen vervullen.

TWEEDE DEEL

EIGEN PROEVEN.

A. Qualitatief onderzoek.

Bij de heerschende onzekerheid betreffende den waren chemischen aard van het reduceerende materiaal, dat men bij zure hydrolyse van bloed in vrijheid stelt, heb ook ik een groot aantal — meestal zéér tijdroovende — proeven genomen, om daarvan iets meer te weten te komen. Alle de verrichte manipulaties hier weer te geven, schijnt mij volkomen overbodig, te meer, daar vaak achteraf bleek, dat een bepaalde bewerking geheel tevergeefs was geweest. Daarom wil ik slechts hier en daar een greep doen, om belangwekkende feiten in het licht te stellen, al moet ik hier al direct toegeven, dat het mij al evenmin als mijn vele voorgangers gelukt is, het probleem tot een definitieve oplossing te brengen.

Allereerst dan het schema van een proef (Schema I),*) die ten eerste de meening van CONDORELLI bevestigt, dat het uit bloedserum of plasma met ammoniumsulfaat neergeslagen globuline-precipitaat het meerendeel van de Hy-S bevat, ten tweede echter aantoon, dat uit dit neerslag in dit geval de helft van de Hy-S met warmen 60% alcohol extraheerbaar was, dus geen integreerend bestanddeel van het globuline uitgemaakt kan hebben. Volkomen kloppen de verkregen cijfers niet, maar dit mag men gerust op rekening van de storende werking van het ammoniumzout schrijven. Verder wilde ik bij deze

*) Zie de uitslaande schemata aan het einde!

proef (die chronologisch een der laatste was) nagaan, of de reduceerende component der hydrolysaten wellicht mannose of galactose was, en daarom verwerkte ik beide fracties op de van deze suikers bekende complexe verbindingen volgens door vroegere onderzoekers aangegeven methoden. Men ziet, dat het aldus met alcohol geëxtraheerde globuline, volgens de methode van FRAENKEL & JELLINEK (45) op *glucosamino-(chitosamino-)mannose* verwerkt, daarvan hoogstens sporen leverde, en voorts, dat uit de Hy-S bevattende alcoholische extracten deze Hy-S *extraheerbaar was met aceton en aether* (dus waarschijnlijk *geen galactolipine* was, zooals ook het uitblijven van kristalvorming na toevoeging van methylphenylhydrazine aan het sterk reduceerende hydrolysaat ervan bevestigde), terwijl daarentegen het pyridine-extract van de tot droog ingedampde extractmassa, dat eventueel aanwezige galactolipinen had moeten bevatten, na zure hydrolyse slechts een spoor reductie vertoonde en met methylphenylhydrazine weliswaar eenige troebeling, maar geen kristallisatie gaf. *Galactose scheen dus afwezig te zijn.*

De volgende proef (Schema II) bevestigt enkele van deze feiten en voegt er nog eenige nieuwe aan toe n.l. aangaande het aandeel van hexosephosphaten en mucoid aan de Hy-S, de nagenoeg volkomen afwezigheid van Hy-S in de albuminefractie, en de onoplosbaarheid der Hy-S in 96 % alcohol en in water:

Hier liet ik runderbloed stollen en glycolyseeren en verwerkte serum en coagula afzonderlijk. De coagula zouden volgens de gangbare meening in de erythrocyten de hexosephosphaten van het bloed moeten bevatten. Daarom verwerkte is ze volgens EMBDEN's procédé: de opbrengst kwam met een gehalte van 0.065 pro mille glucose (uit het reduceerend vermogen na hydrolyse berekend) in het bloed overeen, tegen een uit de Hy-S afkomstig glucose-gehalte van 1.680 pro mille in het plasma. Deze waarden zijn weliswaar hooger dan, maar toch van dezelfde rangorde als de reeds genoemde van LAWACZECK, ROBISON e.a. Quantitatief is dus blijkbaar de hexosephosphaatfractie in bloed toch niet van groot belang.

Van het van de coagula afgescheiden serum werden 400 cc. weer met ammoniumsulfaat behandeld, om de globulinefractie uit te zouten: in

dit geval bevatte het globuline-neerslag 672 mgr. „gebonden glucose”, terwijl in de vloeistof slechts 72 mgr. „gebonden glucose” overbleef. Toen hieruit door verdere toevoeging van ammoniumsulfaat en azijnzuur ook de albuminefractie neergeslagen was, bleek deze slechts 37 mgr. „glucose” te bevatten. Voor zoover men de storende werking van het ammoniumsulfaat op de quantitative bepalingen buiten beschouwing mag laten, levert ook deze proef dus nogmaals het bewijs voor de juistheid van CONDORELLI's meening, *dat de Hy-S zich bijna uitsluitend in de globulinefractie bevindt. Daarvan bleek in 96 % alcohol in het geheel niets oplosbaar, en ook met warm water liet zich maar een kleinigheid extraheeren.*

Toen eenzelfde portie (400 cc.) van hetzelfde serum, dus bevattende $672 + 72 = 744$ mgr. „gebonden glucose”, volgens het door LEVENE (82) aangegeven procédé op mucoid verwerkt was, bleek de „mucoid”-fractie slechts een „gebonden glucose”-gehalte van 10 mgr. te hebben, nog geen $1\frac{1}{2}$ % van het totaal dus. *Ook het mucoid vervult dus blijkbaar slechts een ondergeschikte rol.*

De volgende proef (Schema III) geeft ten eerste een indruk omtrent de *verhouding tusschen het Hy-S-gehalte van de erythrocyten en dat van het plasma*, en ten tweede omtrent den aard der met phenylhydrazine uit het hydrolysaat verkregen kristallen:

De driemaal met physiologische zoutoplossing gewasschen erythrocyten bevatten per cc. een hoeveelheid Hy-S, overeenkomend met 0,77 pro mille glucose, het plasma daarentegen 0,50 pro mille.

Verder ziet men, dat zoowel ammonium- als magnesiumsulfaat, beide voor het uitzouten van het globuline gebruikt, de quantitative zijde van de zaak volkomen bederven. Toch is de waarneming, dat het globuline-neerslag bijna alle Hy-S bevat, geenszins een hierop berustend schijn-effect: ook na extractie der globuline-zoutmassa met 96 % alcohol (*die ook nu weer in het geheel geen Hy-S oploste*), met benzol (dat evenmin Hy-S opnam) en met water, tweemaal herhaald (waarbij slechts sporen Hy-S in oplossing gingen, maar het ammoniumzout volledig verwijderd werd, blijkens de daarna negatieve BaCl_2 -proef) bevatte ze nog zeer veel Hy-S. Toen de door hydrolyse verkregen vloeistof ietwat onvoorzichtig ingedampt werd, verspreidde ze een duidelijken geur naar *caramel*. Den aard der met phenylhydrazine verkregen kristallen, waarvan de eigenschappen in de tabel opgesomd worden, heb ik tot mijn spijt niet kunnen vaststellen: de stof met smeltpunt omstreeks 128° bleek ook in elementair-samenstelling met acetylphenylhydrazine overeen te komen en zal dus ondanks schijnbare verschillen hiermede toch wel identiek geweest zijn: welke echter de natuur was van de curieuse kristallen met smp. $55-59^\circ$ bleef duister.

De thans volgende proef (Schema IV) opent weer nieuwe gezichtspunten, n.l., dat een deel van de reduceerende stoffen van het hydrolysaat vluchtig is, dat de *Molisch*-reactie geen betrouwbare gids is bij deze proeven, dat soms een stof aanwezig is, die reeds in de koude reduceerend werkt, en ten slotte, dat een poging, om gepaarde glycuronzuren te isoleren, geen succes had.

Ten eerste de waarneming, dat het globulinehydrolysaat na indampen in vacuo met azijnzuur niet meer reduceerde: was de reduceerende stof hier afgedestilleerd of in een niet-reduceerende modificatie overgegaan? Waarschijnlijk beide: het destillaat reduceerde zwak, vertoonde een zeer sterke *MOLISCH*-reactie, verspreidde een penetrante reuk naar ranzige boter en leverde met KOH en jodium onmiskbaar jodoform (dit laatste echter wellicht afkomstig van nog achtergebleven sporen alcohol) (het afdestilleeren van een reduceerende fractie zullen wij naderhand nogmaals ontmoeten); voor de tweede mogelijkheid pleit, dat ook het niet meer reduceerende ingedampte hydrolysaat nog een enorm sterke *MOLISCH*-reactie vertoonde.

Verder leverden de vereenigde waterig-alcoholische extracten na hydrolyse met phenylhydrazine in de warmte een „osazon”, dat zich *eerst bij bekoelen* afscheidde, maar daarna in warm water niet meer oploste. Het smolt bij 189° onder ontleding: de hoeveelheid was echter te gering om na omkristalliseeren nogmaals een smeltpunt te bepalen.

Het van globuline en albumine ontdane serum werd ingedampt tot nagenoeg droog, en daarna geëxtraheerd met aether om eventueel aanwezige gepaarde glycuronzuren uit te trekken. Na afdampen van den aether en hydrolyse van het residu met zuur werd een in de warmte zeer sterk, in de koude echter in het geheel niet reduceerende vloeistof verkregen (dit laatste pleit direct *tegen* de aanwezigheid van glycuronzuur!) Met phenylhydrazine ontstonden in de warmte kristallen, lijkend op phenylglucosazon, die echter ook na herhaald omkristalliseeren opvallend donker bleven en een ietwat hoog smeltpunt hadden; voor het bepalen van een mengsmeltpunt met chemisch zuiver phenylglucosazon was de hoeveelheid echter niet toereikend. De identiteit met phenylglucosazon lijkt mij dus op zijn minst twijfelachtig.

Het eerste alcoholische extract der globuline-massa vertoonde deze eigenaardigheid, dat het na hydrolyse met zuur *reeds in de koude reduceerend werkte*: deze eigenschap is o.a. van glycuronzuur en van glycerinaldehyd bekend: het gelukte evenwel niet, karakteristieke phenyl- of methylphenylhydrazine-derivaten te bereiden. Ook deze reductie bij kamertemperatuur ontmoeten wij bij een andere proef nogmaals, en daar zelfs nog in sterkere mate.

De thans volgende proef (Schema V) vereischt weinig commentaar: het was een der eerste tastende experimenten, die ik ondernam, en ik heb haar alleen hier opgenomen, om te laten zien, wat de aard is der neerslagen, die men met aether uit de alcoholische hydrolysaat-extracten verkrijgt (het door BIERRY en Mme RANDOIN ter zuivering toegepaste principe). Men ziet, dat er o.a. een stof in aanwezig is, die aan de lucht spoedig bruinrood wordt, dus blijkbaar oxydabel is en derhalve reduceerend kan werken. Ook deze verkleuring nam ik bij verschillende van mijn proeven waar.

De proef, die thans aan de beurt van bespreking is (Schema VI) vertoont in één en dezelfde fractie het vermogen tot reductie in de koude en de bruinroode verkleuring. Ook dit was een der experimenten uit het begin van mijn onderzoek: daardoor zijn vele fracties nog maar gebrekkig verwerkt. Men zie de tabel voor de curieuse uitkomsten van een aantal reacties.

Tot slot willen wij nog een zeer uitgebreide proef bespreken (Schema VII), die, evenals de in Schema I besprokene, ondernomen werd met het doel, na te gaan, of de Hy-S uit galactolipinen bestond. Daartoe werd een alcoholisch runderbloed-extract volgens de methode van ROSENHEIM (83) achtereenvolgens uitgetrokken met aceton, drogen aether en pyridine. Het pyridine-extract, dat de galactolipinen zou moeten bevatten, bleek inderdaad in dit geval een groote hoeveelheid Hy-S opgenomen te hebben: vermengd met methylphenylhydrazine leverde zijn hydrolysaat weliswaar wat kristallen, maar de hoeveelheid daarvan was te gering, om ze met zekerheid te kunnen identificeeren als galactose-methylphenylhydrazon. Daarnaast was uit het hydrolysaat weer een stof met sterk positieve MOLISCH-reactie af te destilleeren.

De niet in *sterken* alcohol oplosbare component der verdund-alcoholische bloedextracten bevatte een bestanddeel, dat zoowel voor als na hydrolyse bij kamertemperatuur reeds momentane reductie gaf; Hy-S was er evenwel niet in aanwezig, zoodat ook reacties op *dextrinen* (met LUGOL-oplossing) en op *hexosephosphaten* (met brucine) negatief bleven.

In enkele op zichzelf staande proeven kon ik nog de volgende waarnemingen doen:

1. Dat alcoholische bloedextracten bij hydrolyse met H_2SO_4 in de autoclaaf bij 120° geen toename van hun reduceerend vermogen vertoonden, wel daarentegen na hydrolyse met HCl bij 100° ; dit bevestigt de vondst van PAVY (93 blz. 65).

2. Dat de hoeveelheid „glycogeen” in bloed een factor van belang kan zijn. Een meermalen met alcohol geëxtraheerd coagulum van 400 cc. bloed, verwerkt volgens GOLDFEDEROVA (70) (micro-PFLÜGER), leverde volgens het reduceerend vermogen na hydrolyse 60.8 mgr. „glycogeen”, wat overeenkomt met een gehalte van 0.15 pro mille. Dit klopt met de in de literatuur aangegeven waarden.

Daarentegen was uit een andere, evenzoo met alcohol uitgetrokken coagulummassa geen „glycogeen”, d.w.z. geen tegen sterke kaliloog bestendige, bij zure hydrolyse een reduceerend product leverende Hy-S te krijgen, ofschoon zich wel bij toevoeging van alcohol een wit neerslag vormde, dat toenam, naarmate meer alcohol toegevoegd werd, in dit opzicht dus met PAVY's „amylose” overeenkwam. Bij gewone verwerking nam door de zure hydrolyse het reduceerend vermogen niet toe: tot onze Hy-S behoort het dus niet: eerst na $1\frac{1}{2}$ uur durende hydrolyse met 10 % HCl bij $125-130^\circ$ traden inderdaad, overeenkomstig PAVY's aangifte, enig reduceerend vermogen en een zwak positieve MOLISCH-reactie op. Op de verdere eigenaardigheden van deze stof wil ik hier, als buiten mijn bestek liggend, niet nader ingaan.

De poovere resultaten van dit deel van mijn onderzoek resumeerend, meen ik te kunnen zeggen, dat de Hy-S van het bloed-plasma bij half-verzadiging met ammoniumsulfaat voor verreweg het grootste deel met de globulinefractie neerslaat; uit dit neerslag is een groter of kleiner deel met ongeveer 60 % alcohol extraheerbaar, niet echter met 96 % alcohol of met water. Uit het verdund-alcoholische extract is de Hy-S na indampen soms wel, soms niet met aceton en aether

extraheerbaar: in het laatste geval laat ze zich eerst met pyridine uittrekken. Hoewel men aldus verwachten zou, met een of meer galactolipinen te doen te hebben, was in de hydrolysaten geen galactose met zekerheid aan te toonen. Het niet-extraheerbare deel van de Hy-S van het globulineneerslag is naar alle waarschijnlijkheid geen glucosamino-mannose.

Het albumine bevat bijna geen Hy-S.

Volgens het resultaat van verdere proeven ad hoc zou het hexosephosphaatgehalte slechts ten hoogste een paar procent van het totale Hy-S-gehalte bedragen, het mucoid-gehalte evenzoo. Het „glycogeen”-gehalte bedroeg in een der proeven 0.015 %, een waarde, die ook in de literatuur wordt aangegeven. Gepaarde glycuronzuren kon ik niet met zekerheid aantoonen, dextrinen schenen eveneens afwezig. Waren de bekende biosen (lactose, maltose, isomaltose) in eenigszins noemenswaarde hoeveelheid aanwezig geweest, dan had dit bij de osazonbereiding moeten blijken, dus schijnen ook zij vrijwel afwezig.

Voorts moge gereleveerd worden, dat het phenylhydrazine bij de identificatie der reduceerende stoffen in deze proeven slechts zeer beperkte diensten bewezen heeft: eenige malen werden min of meer karakteristieke, o.a. op phenylglucosazon gelijkende kristallen verkregen, maar steeds veel minder, dan men op grond van het sterke reduceerend vermogen der hydrolysaten, wanneer dit inderdaad op rekening van glucose kwam, zou moeten verwachten. Voor een volledige identificatie was de opbrengst nooit groot genoeg, zoodat ik zelfs het voorkomen van glucose of zijn directe polymeren in gebonden vorm nooit met zekerheid heb kunnen vaststellen. Evenmin heb ik ooit in de koude mannose-phenylhydrazon uit het hydrolysaat zien uitkristalliseeren na toevoëging van phenylhydrazine; gegeven de positieve uitkomsten van DISCHE, die evenwel gepubliceerd werden nadat ik deze proefreeks reeds beëindigd had, acht ik mijn proeven ter zake nog onvolledig.

Ook wil ik er op wijzen (met het oog op het feit, dat den laatsten tijd verschillende onderzoekers, o.a. FRAENKEL &

JELLINEK, hun onderzoekingen op geleide van de MOLISCH-reactie doen), dat MOLISCH-reactie en reduceerend vermogen bij hydrolysaten geenszins parallel gaan: ik ontmoette oplossingen met sterke MOLISCH-reactie en volkomen ontbrekend reduceerend vermogen. Daar komt bij, dat mij gebleken is, dat zoowel de stof die deze reactie geeft maar niet reduceert, als een der reduceerende componenten vluchtig en afdestilleerbaar is.

Voorts komt nu en dan in de hydrolysaten een reeds bij kamertemperatuur sterk reduceerend werkend bestanddeel voor, dat misschien wel, misschien ook niet identiek is met een eveneens nu en dan voorkomende stof, die zich aan de lucht al spoedig — blijkbaar door oxydatie — bruin kleurt.

PAVY'S „amylose" scheen weinig of niets met de werkelijke Hy-S uitstaande te hebben.

De eindconclusie moet zijn, dat de Hy-S hoogstwaarschijnlijk niet één, maar een groep van meerdere stoffen is, waarbij de complexe verbindingen der bekende reduceerende suikers maar een ondergeschikte rol vervullen, terwijl wij de chemische natuur van de voornaamste reduceerende component(en) nog niet kennen. Van phenylhydrazine of methylphenylhydrazine heeft men hier voor de identificatie m.i. weinig te hopen: misschien, dat een der andere derivaten, dan wel carbazied of thiosemicarbazied hier nog hulp verschaffen kan. Anders rest ons niets, dan te trachten, de stof in analyseerbare hoeveelheid in substantie te isoleeren.

B. Quantitatief onderzoek.

EERSTE PROEFSERIE: ONDERZOEK VAN *BLOED*.

De onderzoekingen van vroegere auteurs betreffende de gebonden suiker, welke in 't eerste hoofdstuk kort geresumeerd zijn, zijn, wanneer het macro-methoden betrof, meestal op 25—50 cc bloed uitgevoerd. Deze techniek was echter voor mijn doeleinden onbruikbaar, want ik wilde achtereenvolgens

een reeks van bepalingen uitvoeren bij één en hetzelfde konijn; daarom zocht ik naar een geschikte micro-methode. In de litteratuur was toen (1925) evenwel niets anders te vinden dan de zeer omslachtige methode-CONDORELLI (33), een modificatie van de methode van BANG met alle bezwaren van deze, en ik wilde juist snelle seriebepalingen, eventueel zelfs in twee- of drievoud, uitvoeren. Mij restte dus niet anders dan zelf een methode uit te werken, en wel liefst in aansluiting aan de bekende methode van FOLIN & WU, waarmee wij te voren reeds door duizendvoudige ervaring vertrouwd geraakt waren. De hydrolyse met zuur leverde alleen in zoover bezwaren op, dat 't moeilijk scheen de relatief kleine hoeveelheid vloeistof quantitatief te verwerken: insmelten in een glazen buis bracht echter uitkomst.

Toen ik vervolgens trachtte de bekende techniek van FOLIN & WU ook op 't hydrolysaat toe te passen, kwamen nieuwe bezwaren te voorschijn: de wolframaat-oplossing, gevoegd bij een hydrolysaat, dat t.o.v. lakmoid op dezelfde pH gebracht was als men bij gewoon, niet-gehydrolyseerd bloed bij het onteiwitten toepast, gaf een filtraat dat nog zeer onvolkomen van eiwitachtige stoffen bevrijd bleek. Reeds bij 't toevoegen van de alkalische koperoplossing trad een lilarose biureet-tint op; werd 't geheel vervolgens op de gebruikelijke wijze 6 minuten lang in 't kokende waterbad gehouden, dan scheidde zich òf in 't geheel geen koperoxydule af, òf wel was 't ontstane neerslag zeer wankleurig. Als dan ten slotte de molybdeen-oplossing toegevoegd werd, ontstonden dikke neerslagvlokken, die een colorimetrische bepaling ten eenenmale uitsloten, hoewel zich toch steeds een sterk blauwe kleur ontwikkelde. Het zooeven genoemde neerslag loste bij zacht verwarmen op, om bij afkoelen weer neer te slaan en zoo vervolgens. Het bleek echter niet mogelijk, door sterk afkoelen van het filtraat of op andere wijze, de methode bruikbaar te maken.

Daarom was het mij uiterst welkom, toen mijn aandacht viel op een kort te voren door BIERRY & MOQUET (6) bekend gemaakte techniek, die de reeds vroeger door BIERRY, RAN-

DOIN—FANDARD etc. gebruikte en steeds goed bevonden methode van onteiwitten met mercurinitraat combineerde met de methode van FOLIN & WU ter bepaling van de vrije bloedsuiker. Met onbeteekenende modificaties bleek deze techniek ook voor mijn doel bruikbaar; daarom zal ik haar hier in haar definitieven vorm, zooals zij bij al mijn hier volgende quantitatieve bepalingen dienst gedaan heeft, weergeven.

BEPALING VAN DE GEBONDEN BLOEDSUIKER.

Van glasbuis van gewoon, gemakkelijk smeltbaar glas, ter wijfde van $\pm 1\frac{1}{2}$ cm., en met niet te dunnen, maar ook niet te dikken wand (± 1 mm. dik), vervaardigt men een voorraad hydrolyseerbuisen als volgt: Men smelt één uiteinde toe, vervolgens trekt men op ± 20 cm. afstand van deze plaats de buis een weinig uit, zoodat een (niet overdreven) dunwandige insnoering ontstaat, en snijdt dan de buis nog enkele cm. verder in 't wijde gedeelte af. Zoo verkrijgt men een trechtersvormige opening, waardoor de buis gemakkelijk te vullen is, terwijl men deze na vulling op de vernauwde plaats gemakkelijk en snel kan dichtsmelten. Bij voorkeur vervaardige men deze buizen in flink aantal eenige dagen voor het gebruik, omdat er bij 't afkoelen nu en dan scheuren in ontstaan, die een kostbare bepaling kunnen doen mislukken (om deze reden inspecteere men de buizen ook steeds voor 't gebruik!) Vervolgens spoelt men de buizen uit met aqua dest. en laat ze grondig uitlekken en drogen.

Bij een bepaling gaat men nu als volgt te werk: Van het bloedmonster (onstolbaar gemaakt met kaliumoxalaat, en meestal in onze proeven bestaande uit bloed uit de oorvene van konijnen) pipetteert men met een nauwkeurig (eventueel met kaliumbichromaat-zwavelzuur en aq.dest.) gereinigde, droge WASSERMANN-pipet precies 1.- cc. bloed af, droogt de buitenzijde van de pipet af en laat 't bloed door de nauwe opening in de hydrolysebuis vloeien. Vervolgens zuigt men in dezelfde pipet nog 1.- cc. aqua dest. op, en brengt dit waschwater eveneens in de buis. Daarna laat men er uit een buret of pipet nog 3 cc. $\frac{2}{3}$ N.H₂SO₄ bijvloeien. Als alles de nauwe plek gepasseerd is en deze weer vrijwel droog is, smelt men op de insnoering voorzichtig de buis toe, waarbij 't trechtersvormige bovenste gedeelte verwijderd wordt. Is alles afgekoeld, dan schudt men even den inhoud van de buis krachtig dooreen, en zet deze dan in een reageerbuisenrek weg, nadat men er met een diamant een cijfer of letter ter herkenning ingekrast heeft. Zoo zamelt men de buizen op, tot men alles bijeen heeft, om dan alles in één partij te hydrolyseeren.

- In de autoclaaf giet men het noodige water; dan plaatst men een

mandje van fijnmazig draadgaas in welks bodem zich op eenigen afstand van den autoclaaf-bodem bevindt; vervolgens brengt men 't water aan den kook. Is 't eenmaal zoover, dan brengt men tegelijk alle hydrolyse-buizen in het mandje en plaatst het deksel weer op de autoclaaf. Daarna laat men temperatuur en druk zoo snel mogelijk oploopen tot 120° en 1 atm. overdruk, noteert het moment waarop deze waarden bereikt worden en houdt deze omstandigheden gedurende 40 minuten zooveel mogelijk constant. Is deze tijd verstreken, dan dooft men de vlammen en opent den uitlaat. Zoodra de overdruk verdwenen is, opent men 't apparaat en neemt de buizen eruit, om ze verder aan de lucht snel te laten afkoelen. Ook dan is nog eenmaal krachtig doorschudden gewenscht, ofschoon 't geheel in den regel dun vloeibaar is met slechts enkele vlokjes. Is alles koud geworden, dan maakt men vlak bij den top van elke buis een ringvormige kras met een glasmes, en laat met een gloeiend glaspareltje dezen top eraf springen, zoo zuiver mogelijk. Vervolgens voegt men er uit een buret $1\frac{1}{2}$ cc mercuri-nitraat-reagens (zie beneden) bij, sluit de buis met den duim van een pas gewasschen hand, schudt krachtig en strijkt den duim aan den glasrand af, opdat niets verloren gaat. Dan voegt men uit een buret (tot op 0,1 cc nauwkeurig aflezen!) zooveel 2N NaOH toe, tot broomkresolpurperpapier (zie beneden) juist van geel naar violet omslaat. Daartoe moet men de buis weer op dezelfde wijze van tijd tot tijd omschudden; om 't vloeistofverlies bij 't reageren zoo gering mogelijk te maken, neme men een aan één uiteinde fijn uitgetrokken glazen roerstaafje met een klein knopje aan de punt. Met eenige ervaring leert men, reeds aan 't uiterlijk der vloeistof te herkennen, wanneer ongeveer 't juiste punt der titratie bereikt is: bovendien is steeds ongeveer evenveel loog noodig; ook is karakteristiek, dat op het juiste moment het schuimen minimaal is. Hierop ter oriëntering afgaande, kan men 't vloeistofverlies tot 't uiterste beperken. Is eenmaal de juiste p_H bereikt, dan telt men de gebruikte hoeveelheden vloeistof bijeen, en voegt uit een buret nog zooveel aq. dest. toe, dat de som van alle vloeistof 10 cc bedraagt. Vervolgens giet men alles op een gehard filter (Schleicher & Schüll N°. 575) dat niet grooter mag zijn dan strikt noodig is. Den trechter plaatst men op een reageerbuis: is alle vloeistof er uitgelekt, dan neme men hem weg en sluite de reageerbuis met een gave kurk. (Is men niet in de gelegenheid de bepaling te voltooien, dan is er geen bezwaar, in dat stadium alles in ijskast of koelcel te plaatsen tot den volgende dag. *Dit is mij het eenige stadium gebleken waarin dit mogelijk is*). Voor de verdere verwerking behoeft men nog alleen een paar koperspanen in de vloeistof te plaatsen, om 't overtollige kwik te verwijderen: men laat ze er daartoe in koude omgeving 2—3 uur in. Na afloop van dien tijd kan men de vloeistof zonder meer afpipetteeren en voor de bepaling vlg. FOLIN & WU gebruiken, zooals men anders het met wolframaat onteiwitte filtraat gebruikt. Soms zetten zich op de koperspanen nog

grauwe vlokjes neerslag af: zijn deze storend, zooals na hydrolyse met HCl i.pl.v. H_2SO_4 't geval is, dan is er geen bezwaar, nogmaals door een zeer klein filtertje te filtreren. De koperspanen maakt men, door ze na gebruik in de blaasvlam uit te gloeien, opnieuw bruikbaar.

BEPALING VAN DE VRIJE BLOEDSUIKER.

Om de *vrije bloedsuiker* te bepalen is het noodig een passende modificatie van dezelfde methode te gebruiken, wil men vergelijkbare waarden verkrijgen. Hiervoor was onze methode (au fond dezelfde als die van BIERRY & MOQUET l.c.) als volgt: In (vooraf geverifieerde) maatcilinders van 10 cc brengt men op boven beschreven wijze met een WASSERMANN-pipet 1 cc van hetzelfde bloedmonster, voegt hierbij 4 cc aq. dest. om 't te haemolyseeren, en vervolgens, als alles helder lakkleurig geworden is, 1½ cc mercuri-nitrat-reagens (zie beneden). Dan schudt men, na sluiten met den duim, krachtig door, voegt weer zoolang 2N. NaOH toe tot 't omslagpunt van broomkresolpurper-papier bereikt is, en brengt het totale volume met aq. dest. ook hier op 10 cc. Het filtreren, verwijderen van het kwik met koperspanen etc. heeft op geheel dezelfde wijze als boven beschreven plaats.

De eigenlijke bloedsuikerbepaling is voor 't filtraat van het gehydrolyseerde zoowel als voor dat van 't niet-gehydrolyseerde bloed volkomen hetzelfde: in FOLIN & WU-buizen van het daarvoor gebruikelijke model pipetteert men 2 cc van het kwikvrije bloedfiltraat, voegt er 2 cc der alkalische koper-oplossing (zie beneden) bij en plaatst de buizen gedurende 6 minuten in het flink kokende waterbad, waarna men ze snel afkoelt, Dan voegt men er 2 cc van het molybdeen-reagens bij en giet er gedestilleerd water bij tot aan het 25 ccm-merk, geheel overeenkomstig de gewone methode-FOLIN & WU dus. Na den inhoud der buis goed gemengd te hebben leest men in een colorimeter (wij gebruikten dien van AUTENRIETH) de kleurintensiteit tegen de tegelijkertijd met zuivere glucose geprepareerde standaardoplossingen zoo snel mogelijk af.

De samenstelling der benoodigde reagentia is als volgt:

Kwiknitraatreagens van BIERRY—MOQUET—PATEIN—DUFAY (3): 400 G. mercurinitraat in plaatjes lost men op in 700 cc Aq. dest., onder verwarming op 40° C., en voegt zooveel geconcentreerd salpeterzuur toe als strikt noodig is; men schudt tot alles opgelost is, koelt af en voegt (geconcentreerde) natronloog toe, tot zich de eerste sporen van een *blijvend* geel neerslag vertoonen: dan brengt men met Aq. dest. het volume op 1 Liter en filtreert (door een gehard filter). Bij een blinde proef mag het reagens geen eigen reductie vertoonen.

Broomkresolpurper-papier. Filtreerpapierstrooken, gedrenkt in een 4 pro mille oplossing van broomkresolpurper en vervolgens gedroogd.

<i>Alkalische koper-opl.</i> FOLIN—WU <i>Molybdeen-reagens</i> FOLIN—WU <i>Standaard-suikeroplossingen.</i>	}	zie FOLIN, Laboratory Manual of Biological Chemistry. Appleton, New-York & London 1923 p. 255 etc.
---	---	---

Toen, na eenig probeeren, de methode inderdaad bleek te voldoen en ook bij twee-en drievoudige proeven standvastige uitkomsten bleek te geven, terwijl de bij bepaling van de vrije bloedsuiker op deze wijze verkregen waarden bevredigend overeenstemden met die volgens FOLIN & WU of volgens HAGEDORN & JENSEN in hetzelfde bloedmonster bepaald, toen bovendien gebleken was dat het voor 't onstolbaar maken gebruikte natriumoxalaat bij dergelijke hydrolyse en verdere verwerking niet de minste storende werking ontwikkelde en extra-toegevoegde glucose vrijwel quantitatief teruggevonden werd, achte ik de methode voor mijn routine-bepalingen bruikbaar.

Alle volgende suikerbepalingen zijn in tweevoud of zelfs in drievoud gedaan; de colorimeter-aflezingen geschieden veelal, om 't resultaat zoo objectief mogelijk te maken, deels door mijzelf, deels door verschillende, daarin zeer bedreven, medewerksters aan ons laboratorium. Ten eerste kon ik al dadelijk vaststellen, dat inderdaad het reduceerend vermogen van een bloedmonster door hydrolyse vrijwel steeds — en meestal vrij aanzienlijk — toeneemt. Daarbij drong zich evenwel al direct de vraag op of men hierbij niet eenvoudig met reduceerende afbraakproducten van het eiwitmolecule in engeren zin te doen had.

Om dit uit te maken heb ik chemisch zuiver caseïne vlg. *Hammarsten* (van Kahlbaum) in oplossing gebracht met behulp van H_2SO_4 , en van de 6 % oplossing 1 cc verwerkt, alsof het bloed was. Daarbij bleek, dat het reductievermogen zoowel voor als na hydrolyse vrijwel = 0 was.

Vervolgens heb ik dezelfde proef uitgevoerd met onverdund rauw eiwit uit een kippenei. Hier was het resultaat, dat ik daarin een vrij-suikergehalte van 5,31 $\frac{0}{100}$, een totaal-suikergehalte van 5,60 $\frac{0}{100}$ vond; het Hy-S-gehalte bedroeg dus slechts 0,29 $\frac{0}{100}$.

Voorts heb ik enkele geïsoleerde aminozuren (alanine, phenylalanine en tyrosine, alles afkomstig van KAHLBAUM) opgelost en de oplossing verwerkt, alsof het bloed was. Toen bleek, dat inderdaad na een lege artis met kwiknitraat vlg. BIERRY—MOQUET uitgevoerde „onteiwitting” het filtraat geen spoor reductie meer vertoonde, terwijl het colloidaal zinkhydroxyde, zooals bij de bloedsuikerbepalingsmethode van HAGEDORN & JENSEN gebruikt wordt, vooral bij tyrosine volkomen tekort schoot, zoodat het filtraat nog zeer sterk reduceerend werkte.

Op deze gronden meen ik te kunnen uitsluiten, dat de door mij, in het voetspoor van anderen, vastgestelde, vaak aanzienlijke toename van het reductievermogen van *bloed* door hydrolyse berust op de aanwezigheid van destructieproducten van het eiwit als zoodanig: blijkbaar is de gevolgde hydrolyse-methode te zwak om het eiwitmolecuul zelf tot zijn bouwstenen af te breken, en de mercurinitraat-onteiwitmethode zóó afdoende, dat ook van de reduceerende partieele afbraakproducten niets in 't eindfiltraat terecht komt. Dit vast te stellen, is van groot belang, omdat daaruit blijkt, dat onze reduceerende stof kwalitatief geheel iets anders is dan wat vroegere auteurs omstreeks 1900 uit eier-eiwit etc. bereidden door 20—72 uren durende hydrolyse met 20—33 % mineraal zuur (HCl , H_2SO_4) (zie b.v. KOSSEL in MÜLLER & SEEMANN, 86.) Alle toen ter tijd actueele polemieken daaromtrent kunnen wij dus, als niet ter zake dienende, ter zijde laten [alleen vermelden wij, dat ook MÜLLER c.s. (l.c.) uit caseïne zelfs met hun methode geen reduceerend product konden krijgen, uit ei-albumine $\pm 8\%$. Een uitvoerig overzicht over deze proeven, die veeleer de structuur van het eiwit zelf betreffen, vindt men bij L. LANGSTEIN (61, 62)].

Eenige malen heeft men mij voor de voeten geworpen, dat de begrenzing van het heele begrip „gebonden suiker” iets volkomen fictiefs zou zijn. Daarbij ging men dan uit van 't standpunt, dat 't weliswaar heel goed denkbaar is, dat men bij hydrolyse van eiwit met zuren reduceerende stoffen vrijmaakt, maar dat 't onzinnig was deze quantitatief te willen

bepalen. Immers, — zoo redeneerde men — waar ligt de grens? Hoe meer zuur men toevoegt en hoe langer men hydrolyseert, hoe meer reduceerende stoffen men zal vrijmaken, zoolang niet alles afgebroken is. Hierin ligt natuurlijk een kern van waarheid, maar zoo arbitrair zijn door BIERRY c.s. de voorschriften voor de bepaling toch niet vastgesteld: zij hebben wel degelijk die omstandigheden gekozen die hun experimenteel in vergelijkende proeven de beste gebleken waren.

Enkele heb ik, om het fundamenteele belang der zaak, herhaald. Als eerste variabele koos ik: de *hoeveelheid zuur*, die de hydrolyse moet bewerken. Ook Mme RANDOIN heeft dit reeds gedaan, en gevonden, dat binnen zekere (vrij ruime) grenzen de hoeveelheid toegevoegd zuur onverschillig is voor de hoeveelheid eindproduct, die men verkrijgt. Als voorbeeld ontleen ik b.v. aan haar tabel (l.c. pag. 199) 't volgende:

		cc bloed	cc Aq. dest.	cc H ₂ SO ₄ pur.	Totale suiker ‰.
Eén honden- bloed-monster; daarvan:	A.	50	250	3,3	1,87
	B.	50	250	4,2	2,—
	C.	50	250	5,—	2,06
	D.	50	250	5,8	2,06
	E.	50	250	6,6	2,06

Mijn eigen proeven bevestigden deze relatieve onafhankelijkheid van de hoeveelheid zuur. Als voorbeeld diene b.v. het volgende, waarbij ik de concentratieverschillen met opzet nòg grooter koos:

Eén monster konijnenbloed; daarvan (alles in duplo!):

		Totale suiker ‰.
A	1cc bloed + 1cc N.H ₂ SO ₄ + 3cc Aq. dest.	1,94 en 1,91
B	1 „ „ + 2 „ „ + 2 „ „ „	2,52 en 2,50
C	1 „ „ + 3 „ „ + 1 „ „ „	2,51 en (2,32)
D	1 „ „ + 4 „ „ + 0 „ „ „	2,58 en 2,56

De vrije bloedsuiker bedroeg 1,21 ‰.

Een ander voorbeeld, als boven:

A	1cc bloed	+	1cc N.H ₂ SO ₄	+	3cc Aq. dest.	1,55 en 1,51
B	1 „ „	+	2 „ „	+	2 „ „ „	1,96 en 2,06
C	1 „ „	+	3 „ „	+	1 „ „ „	2,47 en 2,48
D	1 „ „	+	4 „ „	+	0 „ „ „	2,66 en 2,18

De vrije bloedsuiker bedroeg 1,02 ‰.

Dit pleit er dus zeker voor, dat de bij de gevolgde techniek afgesplitste reduceerende stoffen inderdaad een zekere entiteit vormen.

Anders daarentegen is 't met den *duur der verhitting*. Daarbij is de tijd van 40 minuten volkomen willekeurig gekozen, en 't zelfde geldt van den *overdruk* van 1 atm.. Laat men deze varieeren, dan krijgt men vrij sterk uiteenlopende waarden, zooals b.v. uit 't volgende voorbeeld blijkt:

Totale suiker	}	Bloed konijn, normaal. Na 40' bij 120°: 1,11 ‰	Na 2 × 40' bij 120°: 1,46 ‰
		Id. na insulinekramp. „ „ „ „ : 0,57 ‰	„ „ „ „ : 0,68 ‰

De *vrije bloedsuiker* bedroeg 0,97 resp. 0,36 ‰, zoodat dus de Hy-S in 't normale bloed volgens de bepaling na 40' verwarmen 0,14, na 2 × 40' 0,49 ‰ bedroeg, in 't krampbloed resp. 0,19 en 0,32 ‰!

Ook wanneer men het zuur, steriel, langdurig in de koude laat inwerken, oefent dit zijn ontledende werking uit; dit bleek uit 't verdere resultaat van bovenstaande proef, waarbij èn van 't normale bloed, èn van 't bloed tijdens de krampen, elk 4 buizen geprepareerd en toegesmolten werden, elk bevattende 1 cc bloed, 3 cc $\frac{2}{3}$ N H₂SO₄ en 1 cc aq. dest..

Van elke bloedsort werd a 1 buis 40' bij 120° gehydrolyseerd.

b 1 „ 2 × 40' bij 120°, direct in aansluiting na elkaar.

c 1 „ 40' bij 120° gehydrolyseerd, waarna de buis toegesmolten bleef staan gedurende 2 dagen.

d 1 „ 40' bij 120° gehydrolyseerd; bleef daarna 2 dagen in toegesmolten toestand staan en werd vervolgens opnieuw 40' op 120° verhit.

Het totaal resultaat was als volgt:

	NORMAAL BLOED			BLOED NA KRAMP		
	Vrije bl.s	Totale bl.s	Hy-S	Vrije bl.s	Totale bl.s	Hy-S
<i>a</i>	0,97	1.11	0.14	0.36	0.55	0.19
<i>b</i>		1.46	0.49		0.68	0.32
<i>c</i>		2.65	1.68		1.31	0.95
<i>d</i>		3.03	2.06		1.79	1.43

Behalve de noodzaak, zich bij de verwerking van het bloed strikt aan de, zij het ook arbitrair vastgestelde, proefcondities te houden, blijkt dus uit deze proef nog iets van veel groter practisch gewicht: *men moet in dit stadium de proef direct verwerken*, mag de buizen niet tot den volgenden dag b.v. laten staan. Nog frappanter bleek dit uit de volgende proef, waarbij ook weer telkens 1 cc bloed + 3 cc $\frac{2}{3}$ N H_2SO_4 + 1 cc aq. dest. in een reeks van buizen ingesmolten werd, en vervolgens 50 (!) minuten bij 120° gehydrolyseerd. In een paar der buizen werd direct de Hy-S bepaald, een aantal andere liet ik ongeopend en dus steriel staan, en opende ze eerst op volgende dagen, om er dan de bepaling in uit te voeren, met 't volgende resultaat:

	NORMAAL BLOED			BLOED 70' NA- INSULINE-INJECTIE		
	Vrije bl.s	Totale bl.s	Hy-S	Vrije bl.s	Totale bl.s	Hy-S
direct	1,07	1.99	0.92	0.13	0.96	0.83
na 1 dag staan		3.56	2.49		2.48	2.35
na 2 dagen staan		2.00	0.93		0.79	0.66
na 3 dagen staan		2.39	1.32		1.30	1.17

Men ziet, hoe men op deze wijze volkomen onregelmatige, onbetrouwbare waarden verkrijgt.

Het kan ook zijn nut hebben, alle Hy-S die wij bij het begin der proeven, dus bij nog intacte dieren, in versch bloed bepaald hebben, te vergelijken met de bijbehorende vrije suikervwaarden: daarbij zullen wij ze eenigszins ordenen naar diersoort en voedingstoestand.

KONIJNEN, 24 UUR VASTEND:

Totale bl.s. .	1.76	1.59	1.75	0.51		Gemiddelde
Vrije bl.s. ...	1.50	0.95	1.23	0.44		1.03
Hy-S	0.26	0.64	0.52	0.07		0.37

KONIJNEN, NIET VASTEND:

Totale bl.s. ...	1.68	1.97	2.43	3.50	1.53	3.43	1.61	1.84	2.44	Gemiddelde
Vrije bl.s. ...	1.14	1.06	1.07	1.32	1.09	1.45	0.93	0.70	0.70	1.05
Hy-S	0.54	0.91	1.36	2.18	0.44	1.98	0.68	1.14	1.74	1.22

HONDEN, NIET VASTEND:

Totale bl.s.	1.26	1.73	1.35	2.49	1.46	1.43	0.57	Gemiddelde
Vrije bl.s.	1.14	1.03	0.85	1.—	1.25	0.86	0.22	0.91
Hy-S	0.12	0.70	0.50	1.49	0.21	0.57	0.35	0.56

Deze cijfers toonen wel heel duidelijk aan, hoe belangrijk de positie van de Hy-S, naast de vrije bloedsuiker is; in vele gevallen bedraagt bij de gevolgde techniek de praktisch meestal verwaarloosde Hy-S, als glucose berekend, nog meer dan de vrije bloedsuiker, waar men zooveel notitie van neemt!

Terloops wijzen wij er nog op, dat onze gemiddelden iets lager zijn dan die van Mme RANDOIN—FANDARD, maar in rangorde er overigens goed mee overeenstemmen: ze bedragen voor de

vrije bls. Hond 0,91 (R.F. : 1,15); Niet-vastend konijn
1,05 (R.F. : 1,19).

Hy-S

Hond 0,56 (R.F. : 0,95); Niet-vastend konijn
1,22 (R.F. : 1,38).

Dit is in procenten:

Hy-S
vrije bls. Hond 62 (R.F. : 83); Niet-vastend konijn
1,16 (R.F. : 1,16).

Daarna heb ik, als inleiding tot mijn seriebepalingen bij insulinedieren, vervolgd, hoe het Hy-S-gehalte zich bij een normaal konijn, dat te voren niet gevestigd had, gedraagt onder invloed van de voor de bepalingen noodzakelijke herhaalde kleine bloedverliezen:

Proef 1.

2 Maart 1925	{	Tijd	9u.45'	10u.50'	12u.—'	1u.10'	2u.50'
		Totale bl.s....	1. 97	1. 64	1. 72	1. 57	1. 75
		Vrije bl.s.	1. 06	0. 96	0. 93	0. 79	0. 94
		Hy-S	0. 91	0. 68	0. 79	0. 78	0. 81
				-0. 23	-0. 12	-0. 13	-0. 10

Veel verandering bewerkt de herhaalde bloeding dus niet; straks, bij onze tweede contrôlereeks, zal blijken dat de uitslagen gewoonlijk nog geringer zijn.

Samenvattend meen ik te mogen concludeeren, dat, mits men zich stelselmatig en strikt houdt aan de principes van een bepaalde, scherp omschreven verwerkingsmethode, i.c. die van BIERRY, de uitkomsten inderdaad vergelijkbare waarden vormen, die niet afkomstig zijn van eiwitafbraakproducten in engeren zin.

WERKING VAN INSULINE.

Vervolgens heb ik de werking van *insuline* op de Hy-S bij konijnen nagegaan, om mij een eigen oordeel te kunnen vormen omtrent de in de literatuur vermelde tegenstrijdige gegevens (zie pag. 17, 18). Met nadruk wijs ik erop, dat ik *deze* reeks van bepalingen uitgevoerd heb op het *bloed in zijn geheel*, terwijl de meeste onderzoekers, zooals ik eerst later bemerkte, *plasma* verwerkten.

De door deze proeven opgeleverde gegevens wil ik in 't volgende in tabelvorm rangschikken. De konijnen, al dan niet vastend, werden subcutaan ingespoten met ieder 3 krampdoses (= 3.3 Internat. Eenheden). Insuline van het fabricage-nummer Organon 329 (droogrest $\pm$ 0,3 mgr. per krampdosis). Vóór de inspuiting en met regelmatige tusschenpoozen (van 30, 40, 50, of 60 minuten) erna werd bloed afgetapt en daarin het Hy-S-gehalte bepaald.

Allereerst mogen hier de proeven op *niet-vastende* konijnen volgen:

Insuline-proeven. Eigen methode. (Bloed). Niet vastende konijnen. Alle insuline subcutaan:

Proef 2. Intervallen 1 uur.

Gewicht dier 2420 Gr.

3 krampdoses Insuline 329 (Droogrest 1 Kr.d. = $\pm 0,3$ mgr.).

4 Maart 1925:

Begin.	Na 1	Na 2	Na 3	Kramp,	Na 4	Na 5	Na 6	
	uur.	uur.	uur.	40 cc	uur.	uur.	uur.	
Totale bl.s.	2.43	0.48	0.35	0.47	20 %	1.21	2.61	2.34
Vrije bl.s.	1.07	0.64	0.50	0.42	glu-	1.27	1.49	1.32
Hy-S	1.36	-0.16	-0.15	0.05	cose.	-0.06	1.12	1.02
d.i. t.o.v. beginwaarde		-1.52	-1.51	-1.31		-1.42	-0.24	-0.34

Proef 3. Intervallen 50'.

Gewicht dier 1950 G.

3 krampdoses Insuline 329.

11 Maart 1925:

Totale bl.s.	3.50	3.04	2.44	3.24	3.10	4.13	4.52
Vrije bl.s. .	1.32	0.68	0.85	0.62	0.52	1.11	1.62
Hy-S	2.18	2.36	1.59	2.62	2.58	3.02	2.90
		+0.18	-0.59	+0.44	+0.40	+0.84	+0.72

Proef 4. Intervallen 40'.

Gewicht dier 1470 G.

3 krampdoses Insuline **329.**

13 Maart 1925:

Totale bl.s.	1.53	0.67	2.02	1.16	1.25	1.39	2.03
Vrije bl.s.	1.09	0.40	0.40	0.40	0.39	0.60	1.09
Hy-S	0.44	0.27	1.62	0.76	0.86	0.79	0.94
		-0.17	+1.18	+0.32	+0.42	+0.35	+0.56

Proef 5. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2200 G.

3 krampdoses Insuline 329.

18 Maart 1925:

					Kramp,				
Totale bl.s.	0.70	0.53	1.04	0.71	0.55	20 cc	2.00	1.71	1.92
Vrije bl.s.	0.98	0.40	0.43	0.33	0.21	20 %	1.12	1.42	1.61
Hy-S	-0.28	0.13	0.61	0.38	0.34	glu-	0.88	0.29	0.31
		+0.41	+0.89	+0.66	+0.62	cose.	+1.16	+0.57	+0.59

Proef 6. Intervallen 30'.

Gewicht dier 2250 Gr.

3 krampdoses Insuline **329.**

24 Maart 1925:

Totale bl.s.	1.61	1.33	1.33	1.01	1.58	1.49
Vrije bl.s. .	0.93	1.16	0.73	0.87	0.74	0.65
Hy-S	0.68	0.17	0.60	0.14	0.84	0.84
		-0.51	-0.08	-0.54	+0.16	+0.16

Proef 7. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2270 Gr.

3 krampdoses Insuline **329.**

27 Maart 1925:

Totale bl.s.	1.84	1.28	1.36	1.24	1.44	1.84	1.88
Vrije bl.s. .	0.70	0.39	0.41	0.53	0.63	0.96	0.99
Hy-S	1.14	0.89	0.95	0.71	0.81	0.88	0.98
		-0.25	-0.19	-0.43	-0.33	-0.26	-0.25

Proef 8. Intervallen 40'.

Gewicht dier 1900 Gr.

3 krampdoses Insuline **329.**

3 April 1925:

Totale bl.s.	2.44	1.41	1.40	1.24	1.30	2.07	2.21
Vrije bl.s. .	0.70	0.00	0.00	0.00	0.34	0.38	0.56
Hy-S	1.74	1.41	1.40	1.24	0.96	1.69	1.65
		-0.33	-0.34	-0.50	-0.78	-0.05	-0.09

Samenvatting der resultaten betreffende het verloop der Hy-S in *bloed* bij *niet*-vastende konijnen onder insuline-invloed

							Interv.
(Proef 2)	-1.52	-1.51	-1.31	-1.42	-0.24	-0.34	60'
(„ 3)	+0.18	-0.59	+0.44	+0.40	+0.84	+0.72	50'
(„ 4)	-0.17	+1.18	+0.32	+0.42	+0.35	+0.50	40'
(„ 5)	+0.41	+0.89	+0.66	+0.62	+1.16	+0.57	40'
(„ 6)	-0.51	-0.08	-0.54	+0.16	+0.16		30'
(„ 7)	-0.25	-0.19	-0.43	-0.33	-0.26	-0.25	40'
(„ 8)	-0.33	-0.34	-0.50	-0.78	-0.05	-0.09	40'

Aansluitend volgen de geheel overeenkomstige proeven op *vastende* dieren:

Proef 9. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2800 Gr.

24 u. gevast.

3 krampdoses Insuline 331.

12 Januari 1926:

Totale bl.s.	1.76	1.15	1.07	kramp	0.94
Vrije bl.s. .	1.50	0.85	0.51		0.46
Hy-S	0.26	0.30	0.56		0.48
		+0.04	+0.30		+0.22

Proef 10. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2950 Gr.

24 u. gevast.

3 krampdoses Insuline 331.

14 Januari 1926:

Totale bl.s.	1.59	1.16	kramp	0.99	1.05	3 ×	1.33	kramp
Vrije bl.s. .	0.95	0.67		0.47	0.42	kramp	0.51	
Hy-S	0.64	0.49		0.52	0.63		0.82	
		-0.15		-0.12	-0.01		+0.18	

Proef 11. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2200 Gr.

24 u. gevast.

3 krampdoses Insuline 331.

21 Januari 1926:

Totale bl.s.	1.75	1.29	0.93	2 ×	0.89	3 ×	0.69
Vrije bl.s. .	1.23	?	0.46	kramp	0.32	kramp	0.25
Hy-S	0.52	?	0.47		0.55		0.44
		?	-0.05		+0.03		-0.08

Proef 12. Intervallen 40'.

Gewicht dier 3450 Gr.

24 u. gevast.

3 krampdoses Insuline 331.

3 Februari 1926:

Totale bl.s.	0.51	0.32	0.57	kr.	0.46	0.41	kr.	0.60	0.69
Vrije bl.s. .	0.44	0.20	0.15		0.23	0.27		0.27	0.18
Hy-S	0.07	0.12	0.42		0.23	0.14		0.33	0.51
		+0.05	+0.35		+0.16	+0.07		+0.26	+0.44

Resultaat:

+0.04	+0.30	+0.22		
-0.15	-0.12	-0.01	+0.18	
?	-0.05	+0.03	-0.08	
+0.05	+0.35	+0.16	+0.07	+0.26 +0.44

Men ziet, dat *in 't eerste uur na de insuline-inspuiting* (3 Krampdoses Insuline-Organon) **steeds** *het totaal-suikergehalte daalt*, m.a.w. dat er dus geen sprake van is, dat eenvoudig de vrije bloedsuiker in den gebonden vorm omgezet wordt zonder meer: dan moest hun som gelijk blijven.

Verder treft ons nog iets anders: *de bescheiden uitslagen, welke het insuline veroorzaakt bij 24 uur vastende dieren, tegenover de enorme schommelingen die bij niet vastende dieren, optreden: wel een bewijs, dat de Hy-S een stof is, die nauw bij de stofwisseling van het dier betrokken is.* Anderzijds is 't merkwaardig, hoe deze groote uitslagen zoowel een toe- als een afname van 't Hy-S-gehalte kunnen betreffen: *in één bepaalden zin scheen het insuline*, althans bij niet-vastende dieren, op het bloed in zijn geheel *niet te werken*.

Voorts wijs ik erop, dat de door CONDORELLI aangegeven regel, als zou bij het intreden van kramp de Hy-S steeds verhoogd zijn, blijkens de resultaten van de proeven 1,9 en 10 zeker niet opgaat, want bij deze vinden wij juist een daling beneden de beginwaarden op het moment der krampen. Straks zullen wij daarvan nog meer voorbeelden ontmoeten.

Samenvattend is dus het resultaat van mijn in 1925 verrichte proeven met het toenmalige insuline, dat bij de gevolgde techniek (*langdurige hydrolyse van bloed*, eigen modificatie der methode-BIERRY) in het eerste uur der insulinewerking de eventueele stijging van het Hy-S-gehalte nooit ten volle opweegt tegen de daling van de vrije bloedsuiker, zoodat het totale suikergehalte in den aanvang *steeds* daalt; voorts, dat de uitslagen, zoowel in positieven als in negatieven zin, bij niet-vastende dieren zooveel grooter zijn dan bij vastende, en ten slotte, dat voor 't tot stand komen der insulinekrampen een stijging van 't Hy-S-gehalte niet onontbeerlijk is.

Denkend aan de mogelijkheid, dat de „gebonden suiker” lactacidogeen of een van zijn verwanten was, heb ik getracht,

vast te stellen of naast de toename van het reductievermogen door zure hydrolyse ook een toename van het *phosphaatgehalte* te vinden was, dit om eventueele hydrolyse van hexosephosphaten op het spoor te komen. Bruikbaar kon alleen een micromethode zijn, die met hoogstens 1 cc bloed al duidelijk quantitative verschillen weergaf; daardoor werd de keuze aanzienlijk beperkt. Een van de weinige methoden, die overbleven, was die van BRIGGS (17): een techniek, die door tal van onderzoekers al gevolgd is en algemeen voldoening gaf bij toepassing op rauw bloed. Ook ik heb mij hiervan, bij toevoeging van verschillende hoeveelheden fosfaat aan een bepaald bloedmonster, bij herhaling kunnen overtuigen: 't extra-toegevoegde vindt men vrijwel quantitatief terug, ofschoon de lagere waarden iets *te* laag, de hoogere iets *te* hoog zijn.

Zoo vond ik b.v. bij een oorspronkelijk fosfaat-gehalte van 0.216 mgr. P. in 2 cc rauw bloed, na extra-toevoeging van fosfaat de volgende waarden terug:

Gevonden	0.216	0.307	0.393	0.546	0.671	0.739
Moest zijn		0.316	0.416	0.516	0.616	0.716
of bij een ander monster:						
Gevonden	0.167	0.266	0.400	0.500	0.578	
Moest zijn		0.267	0.367	0.467	0.567	
Bij een derde:						
Gevonden	0.222	0.311	0.444	0.544	0.644	
Moest zijn		0.322	0.422	0.522	0.622	

Men ziet, dat de overeenstemming redelijk is, voor zoover men althans aan een colorimetrische methode hooge eischen mag stellen.

De poging echter, deze zelfde methode ook op gehydrolyseerd en daarna geneutraliseerd bloed toe te passen, werd een volslagen fiasco. Het trichloorazijnzuur schoot hier volkomen tekort in zijn onteiwittend vermogen, en telkens opnieuw, bij alle denkbare varianten, traden neerslagen op, die een quantitative bepaling uitsloten. Bij andere varianten, die blijkbaar niet den juisten zuurgraad hadden, trad in 't geheel geen kleursontwikkeling op. Andermaal weer verliep alles vlot, maar bleek bij 't aflezen in den colorimeter, dat belangrijke

verliezen geleden waren. Ten slotte echter lukte 't, de methode zoo te kiezen, dat inderdaad een enkele maal de resultaten nauwelijks onder deden voor die der origineele methode-BRIGGS, zooals in 't volgende geval:

Gevonden:	0.507	0.640	0.707	0.774	0.934
Moest zijn:		0.607	0.707	0.807	0.907

Meestal echter waren de gevonden waarden te laag. In 't kort bestonden de modificaties hierin, dat het hydrolysaat volgens de methode van SCHENCK (met sublimaat-HCl) onteiwit werd, waarna er als kwik en H_2S verwijderd waren een 5 % opl. van ammonium-molybdaat in water bijgevoegd werd. Eerst als ook 't hiermee ontstane neerslag verwijderd was, kon in de vloeistof ongestoord de bepaling uitgevoerd worden.

Waar gebleken was, dat filtratie door papier zeer aanzienlijke verliezen gaf, werd steeds gecentrifugeerd. 't Bleek bovendien noodig, de neerslagen uren- tot dagen-lang gelegenheid te geven om uit te vlokken, alvorens ze afgecentrifugeerd werden. Het volledig uitwerken van de methode tot één, die *regelmatig* betrouwbare uitkomsten gaf, bleek evenwel zóó tijdrovend, dat 't resultaat bij mijn hydrolysaten nooit de moeite zou loonen.

Toch wil ik terloops nog op één bijzonderheid de aandacht vestigen, welke mij in den loop van deze onderzoekingen opgevallen is; een korte beschrijving hiervan kan wellicht voor volgende onderzoekers van nut zijn, en kan bovendien misschien nog als physicochemisch studie-object dienen: De blauwe kleurstof, die bij de fosphaat-bepaling van BRIGGS ontstaat, is bijna volkomen uit te schudden in één maal met slechts enkele druppels aethylazijnester. Voegt men dan echter een weinig natriumsulfaat toe, dan gaat de kleurstof opnieuw geheel in de waterige phase. Opnieuw kan men ze hieruit dan afscheiden en in de bovenstaande phase doen overgaan door er eenigen 96% alcohol bij te voegen. De kleurstof adsorbeert zeer sterk aan filtreerpapier, zoodat men 't gebruik hiervan dient te vermijden.

De methode voor fosphaatbepaling vlg. EMBDEN (40) en die van TERADA (107) bleken in de bloedhydrolysaten even-

eens onbruikbaar door vorming van hinderlijke onspecifieke neerslagen.

Waar langzamerhand zooveel methoden ter quantitatieve bepaling van allerlei bloedbestanddeelen gepubliceerd worden, die als eenige motiveering hebben 't feit dat extra-toegevoegde hoeveelheden van de stof in kwestie quantitatief teruggevonden worden, volge hier een voorbeeld, waartoe dit leidt.

't Is een fosphaat-bepaling in een zelfde hydrolysaat, deels volgens mijn eigen boven omschreven modificatie van de methode van BRIGGS, deels volgens die van TERADA, die in dit geval vrij goed lukte. Er werden opklimmende hoeveelheden fosphaat toegevoegd, en 't resultaat was nu als volgt:

Gevonden vlg. Modif.-BRIGGS.....	0.791	0.831	0.910	1.014	1.081
„ „ TERADA	0.244	0.338	0.488	0.579	0.732
Er was toegevoegd	0.100	0.200	0.300	0.400	

Men ziet dat de modificatie-BRIGGS voor 't extra-toegevoegde fosphaat te lage, de methode-TERADA iets te hoge waarden aangaf, maar dit verklaart niet het feit, maakt het zelfs nog zonderling, dat voor het hydrolysaat zelf, zonder extra-fosphaat-toevoeging, de waarden volgens de eene methode *driemaal* zoo hoog zijn dan volgens de andere! Dit doet er zeer sterk aan denken, dat bij de methode met de hoogste uitkomsten, i.c. *bij 't principe van BRIGGS de kleur niet specifiek afhankelijk is van de phosphaten, maar dat ook andere stoffen met het molybdaat in deze omstandigheden kleurstoffen van dezelfde tint ontwikkelen!* 't Is hier weer dezelfde historie als bij de bloedsuiker: hoeveel van 't bloedfosphaat, dat men zoo ijverig quantitatief vervolgt, is inderdaad fosphaat, en wat is de waarde van al 't gecijfer daarmee en van de ten slotte daaruit getrokken conclusies?

Zooals gezegd, waren de moeilijkheden (t.w. de herhaaldelijk en onberekenbaar optredende troebelingen, de daardoor veroorzaakte verliezen aan fosphaat en de onspecificiteit der kleursontwikkeling) zoo vele en de resultaten zoo twijfelachtig, dat ik dit deel van mijn onderzoek niet verder voortgezet heb, daar 't vinden van een regelmatig bruikbare *micro*-methode mij voorshands wel uitgesloten leek. Achteraf gezien zou het voor mijn doel toch verloren moeite geweest zijn, gezien

het waarschijnlijk zeer onbeduidende aandeel der hexosephosphaten aan de Hy-S, en de ontbrekende waarborg, dat, zoo al eenige verandering van 't gebonden-phosphaatgehalte gevonden werd, deze juist van koolhydraat-phosphaten afhankelijk zou zijn.

TWEDE PROEFSERIE: ONDERZOEK VAN BLOED-PLASMA.

Na het onderwerp eenige jaren lang van andere zijden bestudeerd te hebben, en door literatuurstudie opmerkzaam geworden te zijn op de noodzaak, *plasma* voor de quantitatieve onderzoekingen te gebruiken, zooals Fransche (BORDET) en Italiaansche (CONDORELLI) onderzoekers aangeven, besloot ik, niet tevreden met de tot dusver verkregen resultaten, tot een hernieuwd aanval op het probleem: waarom een deel der onderzoekers na toediening van insuline regelmatig een stijging, anderen, waaronder ikzelf, daarentegen haast even regelmatig een daling van het Hy-S.-gehalte van het bloed (plasma) vonden.

Nu stond ik evenwel voor de moeilijkheid, dat, wilde ik mijn eigen methode gebruiken, ik, ter verkrijging van een voldoende hoeveelheid plasma, de dieren een veel te groote hoeveelheid bloed zou moeten aftappen, wilde ik de proeven toch steeds minstens in duplo uitvoeren.

Zoo kwam ik er ten slotte toch toe, de methode-CONDORELLI toe te passen, waarbij voor iedere bepaling slechts 0.1 cc plasma noodig is. Naar mijn ervaring is dit inderdaad, zoodra men over de noodige oefening en behoorlijk zuivere reagentia beschikt, een uitstekende methode, die nog bovendien het voordeel heeft dat ze een titrimetrische, en geen colorimetrische is.

Allereerst moge hier dus het ontoegankelijke origineele voorschrift (33) in extenso volgen:

METHODE-CONDORELLI ter bepaling der „gebonden bloedsuiker”
(Hy-S).

Benoodigde reagentia:

<i>a</i> Hydrolyseerende vloeistof (A):		
Verzadigde opl. van KCl puriss	1300	cc
N HCl	250	cc
$\overline{\text{I}}$		
Aqua dest.	450	cc
<i>b</i> Neutraliseerende vloeistof (B):		
Verzadigde opl. van KCl puriss	1300	cc
N NaOH	250	cc
$\overline{\text{I}}$		
Aqua dest.	450	cc
<i>c</i> Vloeistof (C):		
Verzadigde opl. van KCl puriss	1300	cc
3 % uranylacetaatopl.	200	cc
25 % HCl	3	cc
4 % azijnzuur	5	cc
Aqua dest. ad	2000	cc
<i>d</i> Vloeistof (D) (onteiwittingsvloeistof vlg. BANG):		
Verzadigde opl. van KCl puriss	1300	cc
1½ % uranylacetaatopl.	200	cc
25 % HCl	1½	cc
4 % azijnzuur	2½	cc
Aqua dest. ad.	2000	cc
<i>e</i> Koper-Jodium-oplossing:		
N Kaliumjodaat-oplossing	10	cc
$\overline{\text{I}}$		
CuSO ₄ pur. crystall	0.25	gr
Aq. dest. ad	100	cc
<i>f</i> Alkalische opl.		
K ₂ CO ₃ puriss.	75	gr
Seignettezout (Kalium-natrium-tartraat)	20	gr
Aq. dest. ad	1000	cc
<i>g</i> 20 % H ₂ SO ₄ :		
<i>h</i> 10 % KJ.-oplossing:		
<i>i</i> 1 % oplossing van Amylum solubile, versch en volkomen helder:		
<i>k</i> N natriumthiosulfaat-oplossing.		
100		

De oplossingen C en D kan men eerst een week na hun bereiding gebruiken [men beware ze dan in kolven van *Jena'sch glas*, afgesloten met

geparaffineerde kurken, in het *donker* (in 't licht krijgen uraan-oplossingen reduceerende eigenschappen vlg. ULLMANN 109) A.G.].

Verder is het volgens mijn ervaring noodig, uitsluitend tweemaal uit Pyrex- of Jena-glas gedestilleerd water te gebruiken, en in alle gevallen het gebruik van gummi stoppen en verbindingen geheel te vermijden. Voorts moeten speciaal het KCl en het uranylacetaat herhaaldelijk zorgvuldig omgekristalliseerd worden, daar de zg. zuiverste handelspreparaten vaak de grofste verontreinigingen bevatten. Aan de benoodigde reagentia wensch ik nog toe te voegen:

1. Houdbare jodaat-stamoplossing vlg. BANG. (MICROMETHODEN pag. 36, Wiesbaden, BERGMANN, 1922).

KJO ₃ puriss	3,5667 Gr.
20 % H ₂ SO ₄	20 cc
Aq. dest. ad	1 Liter

2. 2 % H₂SO₄, in ballonspuitflesch. A.G.].

Methodiek:

- a. *Bloed*: In een klein volkomen schoon centrifugeerbuisje brengt men enkele kristalletjes Citras natricus puriss. Dan reinigt men den vingertop en geeft een prik met de naald van FRANKE. [Bij 't konijn wrijft men 't oor af met een watje met xylol en snijdt een randvene aan. Bij goede techniek kan men met dit ééne wondje voor den heelen duur der proef volstaan A.G.]. 't Uitvloeiende bloed laat men onder voortdurend schudden [beter is: roeren met een fijn uitgetrokken glasstaafje A.G.], in het buisje druppelen tot men 1—2 cc heeft; dan centrifugeert men direct.
- b. *Hydrolyse*: Met een in duizendsten [of honderdsten A.G.] verdeelde, vooraf getareerde pipet meet men zoo nauwkeurig mogelijk 0.2 cc af en laat daarvan telkens 0.1 cc in 2 reageerbuisjes van 8 of 9 cc inhoud vloeien. Bij het eene buisje voegt men 6 cc van vloeistof D en kan dan verder daarin het vrije bloedsuiker-gehalte bepalen. Aan den inhoud van het andere buisje voegt men 1½ cc van de vloeistof A toe en bepaalt dan het gehalte aan Hy-S als volgt: Zoodra men vloeistof A toegevoegd heeft, coaguleert het eiwit: men schudt het buisje, dekt het af met een glazen deksel, zet het in een beker glas [bij serieproeven zamelt men alle te hydrolyseeren buisjes op en zet ze samen in een passend rekje van ijzergaas A.G.] en plaatst het geheel in de reeds kokende, rijkelijk stoom ontwikkelende autoclaaf, sluit dezen [eenvoudige beugelsluiting is dus te verkiezen boven die met vele moeren! A.G.] en sluit ook, zoodra de lucht ontweken is, den uitlaat. Men let op, wanneer de overdruk tot 1 Atm. gestegen is, en houdt dezen toestand gedurende 10 minuten constant: talrijke experimenten hebben [vlg. CONDORELLI althans: zie mijn eigen

meening pag. 34 A.G.] bewezen, dat hierbij de afsplitsing van de tevoren gebonden suiker volkomen is. Dan laat men den druk in den autoclaaf geleidelijk dalen en neemt ten slotte het buisje er uit.

- c. *Neutralisatie en onteiwitting*: Vervolgens voegt men nauwkeurig 1.5 cc van vloeistof B toe (een eventueel teveel van 0,02 cc A is onschadelijk, overmaat van B daarentegen belet de volledige verwijdering van het eiwit: daarom beide uiterst nauwkeurig afmeten!). Men schudt, opdat beide vloeistoffen zich goed vermengen, voegt 3 cc van vloeistof C toe, keert het buisje twee- of driemaal om en om, en laat het 4 uur in het donker staan. (Na ongeveer 2 uur, als het eerst ontstane neerslag op den bodem gezakt is, vormt zich een nieuwe troebeling, die zeer langzaam neerslaat. Wacht men niet lang genoeg, dan krijgt men te hoge waarden. Toch moet de aanraking met de uraanhoudende oplossing ook weer niet te lang duren, daar dan andere storende verschijnselen optreden, bestaande in een katalytische werking van het uraan, die reduceerende producten levert. Daarom moet men ook ieder direct zonlicht vermijden). Kan men na verloop van 4 uur de verdere verwerking niet meer uitvoeren, dan filtreere men toch in elk geval en beware het filtraat in het donker.

De filtratie moet men met de volgende voorzorgen uitvoeren:

De reeds klaargemaakte filters worden in een groote ontwikkelschaal 24—48 uur in stroomend water gehouden, dan in kokend, met azijnzuur aangezuurd gedestilleerd water gewasschen, dit een paar maal herhaald, dan nog eens met zuiver kokend Aq. dest. gespoeld en ten slotte in de broedstoof gedroogd (niet in de droogstoof, omdat daar de hoge temperaturen allicht tot het ontstaan van reduceerende afbraakproducten van het papier leiden).

De filtratie voert men zoo uit, dat men eerst een goed tegen den glaswand aanliggend filter met Aq. dest. bevochtigt, dan de vloeistof erop uitgiet, het buisje nogmaals met 6 cc van vloeistof D omspoelt en ook dit op het filter giet. Het filtraat verzamelt men in kolfjes van 60 cc [liever 100 cc Jena A.G.] inhoud met ronden bodem en wijden korten hals.

Van dit punt af is de verdere verwerking precies als bij de micro-methode voor bepaling van de vrije bloedsuiker volgens BANG, naar wiens publicatie voor détails verwezen moge worden: in groote trekken is zij als volgt: Men voegt 1 cc [om op alles voorbereid te zijn, liever 2 cc A.G.] der jodaat-koper-oplossing en 2 cc der alkalische oplossing F toe, plaatst 't 4 minuten in 't kokende waterbad [beter is 't door BANG voorgeschreven indirecte koken met stoom A.G.], voegt er 2 cc 20 % H_2SO_4 bij [nadat men bij gebruik van BANG's kookapparaat, het kolfje eerst een eindweegs heeft laten zakken en het bolvormig uiteinde van de stoombuis snel afgespoten heeft men een straaltje 2 % H_2SO_4 , dat men ook in 't kolfje opvangt A.G.],

voegt 20 cc koud Aq. dest. toe en laat dan afkoelen [beter is, om vervluchtiging van jodium zooveel mogelijk tegen te gaan, direct vlug onder de kraan te koelen en dan eerst na 5 minuten staan het water toe te voegen A.G.].

Dan titreert men als volgt: men voegt 0.5 cc 10 % KJ en 0.5 cc [10 druppels A.G.] 1 % amylum solubile [versch bereid A.G.] toe, en titreert het vrijkomende [vrijgekomen A.G.] jodium met $\frac{N}{100}$ of $\frac{N}{200}$

natriumthiosulfaat-oplossing. Zoo kan men, na aftrekken van de blinde proef, (die niet meer dan 0.03 cc 0.01 N jood-oplossing mag bedragen) berekenen, hoeveel jodaat door het koper-oxyduul gereduceerd is, en daaruit indirect, hoeveel het gehalte aan suiker pro mille bedroeg: 0.280 cc $\frac{N}{100}$ Jodaat-oplossing worden gereduceerd

100

door de hoeveelheid koperoxyduul, die 0.1 mgr. Glucose levert.

Voor de bepaling van de vrije bloedsuiker gaat men als volgt te werk. In het buisje met 0.1 cc bloedplasma brengt men 6 cc van vloeistof D, en verwerkt dan het mengsel, nadat het 4 uur in het donker gestaan heeft, precies als voor de bepaling van het totaal suiker-gehalte beschreven werd. Trekt men dan van het totaal suiker-gehalte het gehalte aan vrije bloedsuiker af, dan verkrijgt men het cijfer voor de „gebonden suiker” of Hy-S.

Nadat vele aanvankelijke pogingen, om deze methode toe te passen, gefaald hadden, slaagde ik er eindelijk toch in, de foutenbronnen door diverse voorzorgen te elimineren: de aanvullingen, die het oorspronkelijke voorschrift volgens mijn ervaringen behoeft, zijn in het bovenstaande tusschen [] geplaatst. Aldus geloof ik de methode nog beter voor algemeen gebruik geschikt gemaakt te hebben: van tijd tot tijd ondernam ik tijdens mijn dierproeven contrôlebepalingen op glucose-oplossingen van bekende sterkte, die steeds de juiste uitkomst leverden. Hoofdzaak is, dat men over goede reagentia beschikt, en hier zijn de duurste lang niet altijd de beste!

Allereerst dan mogen de resultaten van een paar contrôle-proeven volgen, genomen met het doel, vast te stellen, of het herhaalde bloedverlies op zichzelf geen noemenswaard effect op het Hy-S-gehalte heeft, zooals ook uit de reeds vermelde contrôleproef met mijn eigen hydrolysemethode scheen te volgen. Inderdaad was geen belangrijke afwijking waar te nemen, zooals de volgende cijfers leeren:

Contrôle-proeven. Plasma-Methode-CONDORELLI. *Niet vastende konijnen.*

Proef 13. Interval 40'.

5 Maart 1929:

Totale bls.	1.96	1.86	1.75	1.78	1.93	1.75	1.86
Vrije bls. .	1.53	1.53	1.39	1.39	1.36	1.25	1.28
Hy-S	0.43	0.33	0.36	0.39	0.57	0.50	0.58
		-0.10	-0.07	-0.04	+0.14	+0.07	+0.15

Proef 14. Interval 40'.

18 Maart 1929:

Totale bls.	1.60	1.54	1.50	1.57	1.50	1.60	1.60
Vrije bls. .	1.25	1.21	1.07	1.04	1.11	1.11	1.07
Hy-S	0.35	0.33	0.43	0.53	0.39	0.49	0.53
		-0.02	+0.08	+0.18	+0.04	+0.14	+0.18

Proef 15. Interval 40'.

28 Maart 1929:

Totale bls.	2.21	2.18	2.11	2.14	2.07	2.03	2.07
Vrije bls. .	1.86	1.93	1.78	1.86	1.82	1.78	1.71
Hy-S	0.35	0.25	0.33	0.28	0.25	0.25	0.26
		-0.10	-0.02	-0.07	-0.10	-0.10	-0.09

Resultaten der contrôleproeven:

	-0.10	-0.07	-0.04	+0.14	+0.07	+0.15
	-0.02	+0.08	+0.18	+0.04	+0.14	+0.18
	-0.10	-0.02	-0.07	-0.10	-0.10	-0.09
Gemidd. .	-0.07	0	+0.02	+0.03	+0.04	+0.08

INSULINE.

Thans mogen de resultaten volgen, verkregen na subcutane injectie van diverse insulinepreparaten (N.B. 1 krampdosis = ca. 1,1 Internat. Eenheid);

Insuline subcutaan. Methode-CONDORELLI. *Plasma.*

Proef 16. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2530 Gr. Niet gevast.

1½ krampdosis Insuline **S 331.** (1 kr.d. = 0.3 mgr.).

8 Februari 1929:

Totale bls.	2.32	1.61	1.25	1.32	1.21	1.39	1.39
Vrije bls. .	1.78	1.18	0.86	0.68	0.89	0.79	0.86
Hy-S	0.54	0.43	0.39	0.64	0.32	0.60	0.53
		-0.11	-0.15	+0.10	-0.22	+0.06	-0.01

Proef 17. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2150 Gr. 24 u. gevast.

1 krampdosis Insuline **S 331.**

19 September 1928:

Totale bl.s.	1.99	1.24	1.10	1.03	(2 × Kramp)	0.95
Vrije bl.s. .	1.25	0.61	0.61	0.70		0.67
Hy-S	0.74	0.63	0.49	0.33		0.28
		-0.11	-0.25	-0.41		-0.46

Proef 18. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2320 Gr. 1½ dag gevast.

1 krampdosis Insuline **S 331.**

6 November 1928:

Totale bl.s.	2.28	1.68	1.60	1.55	1.52	1.55	1.85
Vrije bl.s. .	1.57	0.96	0.81	0.81	0.77	0.69	0.99
Hy-S	0.71	0.72	0.79	0.74	0.75	0.86	0.86
		+0.01	+0.08	+0.03	+0.04	+0.15	+0.15

Proef 19. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2300 Gr. 1½ dag gevast.

1 krampdosis Insuline **S 331.**

21 November 1928:

Totale bl.s.	2.68	1.69	1.53	1.43	1.37	1.57	1.48
Vrije bl.s. .	1.39	0.79	0.68	0.57	0.64	0.71	0.87
Hy-S	0.69	0.90	0.85	0.86	0.73	0.86	0.61
		+0.21	+0.16	+0.17	+0.04	+0.17	-0.08

Proef 20. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2920 Gr. 1½ dag gevast.

1 krampdosis Insuline **S 331.**

26 November 1928:

Totale bl.s.	2.60	2.19	1.84	1.73	1.63	1.52	1.63
Vrije bl.s. .	1.76	1.67	1.23	0.95	0.86	0.70	0.81
Hy-S	0.84	0.52	0.61	0.78	0.77	0.82	0.82
		-0.32	-0.23	-0.06	-0.07	-0.02	-0.02

Proef 21. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2500 Gr. 3 dagen gevast.

2 krampdoses Insuline **S 331.**

13 November 1928:

Totale bl.s.	5.14	2.89	2.28	2.32	2.21	2.32	2.17
Vrije bl.s. .	1.82	1.68	0.89	0.66	0.55	0.54	0.62
Hy-S	3.32	1.21	1.39	1.66	1.66	1.78	1.55
		-2.11	-1.93	-1.66	-1.66	-1.54	-1.77

Proef 22. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2450 Gr.

3 dagen gevast.

1 krampdosis Insuline **S 331.**

22 Januari 1929:

Totale bl.s.	2.07	1.47	0.86	1.11	1.36	1.32	1.46
Vrije bl.s. .	1.36	0.61	0.50	0.47	0.57	0.72	0.72
Hy-S	0.71	0.86	0.36	0.64	0.79	0.60	0.74
		+0.15	-0.35	-0.07	+0.08	-0.11	+0.03

Proef 23. Intervallen 40'.

Gewicht dier 1850 Gr.

3 dagen gevast.

1 krampdosis Insuline **S 331.**

26 Januari 1929:

Totale bl.s.	1.86	1.50	1.46	1.03	1.14	1.21	1.21
Vrije bl.s. .	1.39	1.11	0.64	0.68	0.43	0.50	0.75
Hy-S	0.47	0.39	0.82	0.35	0.71	0.71	0.46
		-0.08	+0.35	-0.12	+0.24	+0.24	-0.01

Proef 24. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2600 Gr.

2 dagen gevast.

9 krampdoses Insuline **Degewop 550.4** (1 Kr.d. = ...mgr.).

7 Februari 1929:

Totale bl.s.	1.78	1.46	0.82	0.75	(3 × Kramp)		0.54
Vrije bl.s. .	1.21	0.89	0.39	0.21			0.18
Hy-S	0.57	0.57	0.43	0.54			0.36
		0	-0.14	-0.03			-0.21

Proef 25. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2580 Gr.

24 uur gevast.

2 krampdoses Insuline (**Internat. Standaard**) (1 Kr.d. = 0.138 mgr.).

30 October 1928:

Totale bl.s.	2.72	2.11	1.90	1.57	1.63	1.62	(Kramp)	1.39
Vrije bl.s. .	1.27	1.18	0.63	0.77	0.56	0.43		0.53
Hy-S	1.45	0.93	1.27	0.80	1.07	1.19		0.86
		-0.52	-0.18	-0.65	-0.38	-0.26		-0.59

Proef 26. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2150 Gr.

Niet gevast.

3 krampdoses krampvrije insuline **B₁₅** (1 Kr.d. = 0.015 mgr.).**2 dagen** oude oplossing.

8 Maart 1929:

Totale bl.s.	2.28	2.18	1.82	1.78	1.89	2.07	1.96
Vrije bl.s. .	2.00	1.57	1.32	1.11	1.25	1.14	1.36
Hy-S	0.28	0.61	0.50	0.67	0.64	0.93	0.60
		+0.33	+0.22	+0.39	+0.36	+0.65	+0.32

Proef 27. Intervallen 40'.

Gewicht hier 1900 Gr.

Niet gevast.

3 krampdoses zelfde praeparaat.

1 dag oude oplossing.

19 Maart 1929:

Totale bl.s.	1.71	1.82	1.36	1.54	1.50	1.54	1.71
Vrije bl.s. .	1.21	1.21	0.75	0.89	0.86	0.14	1.04
Hy-S	0.50	0.61	0.61	0.65	0.64	0.50	0.67
		+0.11	+0.11	+0.15	+0.14	0	+0.17

Proef 28. Intervallen 40'.

Gewicht hier 2000 Gr.

Niet gevast.

3 krampdoses zelfde praeparaat.

3 dagen oude oplossing.

21 Maart 1929:

Totale bl.s.	2.04	1.64	1.14	1.25	1.46	1.50	1.50
Vrije bl.s. .	1.75	1.18	0.71	0.57	0.82	1.07	1.14
Hy-S	0.29	0.46	0.43	0.68	0.64	0.43	0.36
		+0.17	+0.14	+0.39	+0.35	+0.14	+0.07

Proef 29. Intervallen 40'.

Gewicht hier 2120 Gr.

Niet gevast.

3 krampdoses zelfde praeparaat.

4 dagen oude oplossing.

22 Maart 1929:

Totale bl.s.	2.21	1.89	1.50	1.68	1.71	1.71	1.89
Vrije bl.s. .	1.57	1.54	0.89	0.75	0.86	0.79	0.97
Hy-S	0.64	0.35	0.61	0.93	0.85	0.92	0.92
		-0.29	-0.03	+0.29	+0.21	+0.28	+0.28

Proef 30. Intervallen 40'.

Gewicht hier 2200 Gr.

2 dagen gevast.

3 krampdoses zelfde praeparaat.

1 dag oude oplossing.

7 Maart 1929:

Totale bl.s.	2.57	2.25	1.60	1.57	1.54	1.71	1.89
Vrije bl.s. .	2.14	1.64	0.82	0.61	0.82	0.82	1.18
Hy-S	0.43	0.61	0.78	0.96	0.72	0.89	0.71
		+0.18	+0.35	+0.53	+0.29	+0.46	+0.28

Proef 31. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2150 Gr.

2 dagen gevast.

3 krampdoses zelfde praeparaat.

7 dagen oude oplossing.

25 Maart 1929:

Totale bl.s.	2.36	2.14	1.61	1.75	1.79	1.96	1.96
Vrije bl.s. .	1.50	1.32	0.79	0.86	0.93	1.04	1.28
Hy-S	0.86	0.82	0.82	0.89	0.86	0.92	0.68
		-0.04	-0.04	+0.03	0	+0.06	-0.18

Proef 32. Intervallen 40'.

Gewicht dier 2000 Gr.

Niet gevast.

3 krampdoses zeer zuiver **insuline X** (1 Kr.d. = 0.008 mgr.).**1 dag** oude oplossing.

19 April 1929:

Totale bl.s.	2.21	2.29	1.89	1.61	1.61	1.78	2.25
Vrije bl.s. .	1.84	1.78	1.36	0.93	1.11	1.18	1.61
Hy-S	0.37	0.51	0.53	0.68	0.50	0.60	0.64
		+0.14	+0.16	+0.31	+0.13	+0.23	+0.27

Uit de enkele proeven, waar kramp optrad (Proef 17, 24, 25) blijkt weer ten duidelijkste, evenals uit onze vorige proefreeks, *dat vlak voor of na het optreden van kramp het Hy-S-gehalte geenszins verhoogd behoeft te wezen*, zooals CONDORELLI beweerde: ook hier was, evenals in mijne vorige proefreeks, juist verlaging regel.

Wat leeren deze proeven, met de methode-CONDORELLI verkregen verder?

Allereerst willen wij de *niet-vastende konijnen* beschouwen; het beloop van de achtereenvolgende Hy-S bepalingen t.o.v. de aanvangswaarde was als volgt:

Proef 16.	Praep.	S 331	(1 kr. d. = 0.300 mgr.)	-0.11	-0.15	+0.10	-0.22	+0.06	-0.01
" 26	"	B 15	(1 " " = 0.015 ")	+0.33	+0.22	+0.39	+0.36	+0.65	+0.32
" 27	"	"		+0.11	+0.11	+0.15	+0.14	0	+0.17
" 28	"	"		+0.17	+0.14	+0.39	+0.35	+0.14	+0.07
" 29	"	"		-0.29	-0.03	+0.29	+0.21	+0.28	+0.28
" 32	"	X	(1 kr. d. = 0.008 mgr.)	+0.14	+0.16	+0.31	+0.13	+0.23	+0.27

Direct in aansluiting hieraan mogen de waarden voor 1—3 dagen *vastende* dieren volgen:

Proef 17. Praep. S 331 (1 kr. d. = 0.300 mgr.)	—0.11	—0.25	—0.41	—0.46		
„ 18 „ „ „ „ „	+0.01	+0.08	+0.03	+0.04	+0.15	+0.15
„ 19 „ „ „ „ „	+0.21	+0.16	+0.17	+0.04	+0.17	—0.08
„ 20 „ „ „ „ „	—0.32	—0.23	—0.06	—0.07	—0.02	—0.02
„ 21 „ „ „ „ „	—2.11	—1.93	—1.66	—1.66	—1.54	—1.77
„ 22 „ „ „ „ „	+0.15	—0.35	—0.07	+0.08	—0.11	+0.03
„ 23 „ „ „ „ „	—0.08	+0.35	—0.12	+0.24	+0.24	—0.01
„ 24 „ Degewop 550.4 (1 kr. d. = ... mgr.)	0	—0.14	—0.03	—0.21		
„ 25 Intern. Stand. (1 kr. d. = 0.138 mgr.)	—0.52	—0.18	—0.65	—0.38	—0.26	—0.59
„ 30 Praep. B 15 (1 kr. d. = 0.015 mgr.)	+0.18	+0.35	+0.53	+0.29	+0.46	+0.28
„ 31 „ „ „ „ „	—0.04	—0.04	+0.03	0	+0.06	—0.18

Ter vergelijking herhalen wij hier de uitkomsten van onze eerste proefserie, met onze eigen methode verkregen.

Niet vastende konijnen:

Proef 2. Praep. 329 (1 kr. d. = ± 0.3 mgr.)	—1.52	—1.51	—1.31	—1.42	—0.24	—0.34
„ 3 „ „ „ „	+0.18	—0.59	+0.44	+0.40	+0.84	+0.72
„ 4 „ „ „ „	—0.17	+1.18	+0.32	+0.42	+0.35	+0.50
„ 5 „ „ „ „	+0.41	+0.89	+0.66	+0.62	+1.16	+0.57
„ 6 „ „ „ „	—0.51	—0.08	—0.54	+0.16	+0.16	
„ 7 „ „ „ „	—0.25	—0.19	—0.43	—0.33	—0.26	—0.25
„ 8 „ „ „ „	—0.33	—0.34	—0.50	—0.78	—0.05	—0.09

Vastende konijnen:

Proef 9. Praep. 329		+0.04	+0.30	+0.22		
„ 10 „		—0.15	—0.12	—0.01	+0.18	
„ 11 „		?	—0.05	+0.03	—0.08	
„ 12 „		+0.05	+0.35	+0.16	+0.07	+0.26
						+0.44

Uit deze cijfers kunnen wij in 't kort de volgende conclusies trekken:

Bij toepassing van mijn eigen hydrolyse-methode (duur 40') vertoonen de Hy-S-waarden der niet-vastende dieren (Proef 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) in 't algemeen veel grooter uitslagen (zoowel in positieve als in negatieve richting) dan die der vastende dieren (Proef 9, 10, 11, 12). Bij gebruik der methode-CONDORRELLI daarentegen (hydrolyseduur slechts 10') zijn met een

enkele uitzondering de uitslagen veel kleiner, (wat dus klopt met 't resultaat van mijn reeds op pag. 34 vermelde contrôleproeven.)

Een absolute waarde hebben de aldus bepaalde cijfers dus niet: alleen uit hun relatieve grootte t.o.v. cijfers uit andere proef- of contrôlereeksen, met dezelfde techniek verkregen, mag men conclusies trekken, alsmede uit hun positieven of negatieven zin. Dit laatste, d.w.z. de vraag, of insuline de Hy-S doet toe- of afnemen, is juist het strijdpunt, waarom het hier gaat. Bij oppervlakkige beschouwing der cijfers schijnen ook mijn proeven de zaak nog onbeslist te laten. Nauwkeuriger waarneming leert echter anders, en wel *blijkt het hier in hoofdzaak op de zuiverheid der gebruikte preparaten aan te komen*. Immers:

Preparaat 329 (1 kr. d. = $\pm 0,3$ mgr)	leverde 30 pos. en 28 neg. waarden, d.i.	
		52 % pos. en 48 % neg.
Preparaat S 331 (1 kr. d. = 0.300 mgr)	leverde 19 pos. en 27 neg. waarden, d.i.	
		41 % pos. en 59 % neg.
Preparaat Degewop 550.4 (1 kr. d. = mgr)	leverde 3 neg. waarden, d.i.	100 % neg.
Praeparaat Internat. Stand. (1 kr. d. = 0.138 mgr)	leverde 6 neg. waarden, d.i.	100 % neg.

Daarentegen leverde

Praeparaat B 15 (1 kr. d. = 0.015 mgr)	29 pos. en 5 neg., d.i.	85 % pos. en 15 % neg.
Praeparaat X (1 kr. d. = 0.008 mgr)	6 pos., d.i.	100 % pos.

Deze laatste preparaten behooren tot de zuiverste, welke tot dusverre bekend zijn: zij overtreffen zelfs ABEL's z.g. kristallijne insuline, welks droogrest per eenheid nog 3—4 maal zoo groot is, in dit opzicht verre.

Men mag dus inderdaad aannemen, *dat het werkelijke insuline inderdaad*, zooals ook CONDORELLI e.a. reeds jaren geleden aangaven, *het Hy-S-gehalte regelmatig doet stijgen*, te meer waar de enkele negatieve cijfers verkregen werden met oplossingen, die reeds 4 resp. 7 dagen oud waren, en het bekend is, dat deze zuivere insuline-oplossingen snel in werkzaamheid achteruitgaan. Dat minder zuivere oplossingen zoo wisselend effect hebben, en zelfs vaak aanzienlijke dalingen van het Hy-S-gehalte bewerken kunnen, zou dan berusten moeten op

de gelijktijdige aanwezigheid van een verlagend agens, dat bij het procédé, dat de verregaande zuivering bewerkt, n.l. de adsorptie van het insuline aan zeer selectief werkzame plant-aardige kool (sommige Norit-preparaten), verwijderd wordt, doordat het niet geadsorbeerd wordt en in het filtraat blijft.

Dat in dit filtraat inderdaad dit Hy-S-verlagend agens (juist datgene, wat wij om vroeger vermelde redenen zoeken!) aanwezig is, kon ik ook rechtstreeks aantonen:

Proef 33. Intervallen 40'.

Insuline-afvalfractie. Subcutane injectie. Dosis 1 mgr. Plasma.

Konijn 2500 Gr.

Niet gevestigd.

26 April 1929:

Totale bl.s.	2.61	2.36	2.28	2.14	2.25
Vrije bl.s.	1.71	1.64	1.57	1.43	1.46
Hy-S	0.90	0.72	0.71	0.71	0.79
		-0.18	-0.19	-0.19	-0.11

Proef 33a. Intervallen 40'.

Analoog preparaat.

Konijn 2200 Gr.

Niet gevestigd.

24 Mei 1929:

Totale bl.s.	2.04	1.78	1.68	1.71	1.68	1.64
Vrije bl.s.	1.28	1.28	1.21	1.28	1.36	1.46
Hy-S	0.76	0.50	0.47	0.43	0.32	0.18
		-0.26	-0.29	-0.33	-0.44	-0.58

Proef 33b. Intervallen 40'.

Analoog preparaat (blijkbaar minder goed van insuline bevrijd).

Konijn 1600 Gr.

Niet gevestigd.

5 Juni 1929:

Totale bl.s.	1.96	2.07	1.68	1.57	1.43	1.57	1.57
Vrije bl.s.	1.46	1.64	1.32	0.93	1.00	1.18	1.32
Hy-S	0.50	0.43	0.36	0.64	0.43	0.39	0.25
		-0.07	-0.14	+0.14	-0.07	-0.11	-0.25

Wanneer verdere proeven deze vondst bevestigen, zouden wij hier wellicht een belangrijken stap voorwaarts hebben gedaan naar het einddoel: de bereiding van stoffen, die in staat zijn, de Hy-S duurzaam te verlagen.

Immers, naar het mij voorkomt hebben wij van andere agentia, waarvan men een Hy-S-verlagende werking aangegeven heeft, niet veel te hopen. Zoo hadden b.v., zooals reeds op blz. 17 aangegeven, CONDORELLI en ook anderen een acute daling van het Hy-S-gehalte waargenomen kort na inspuiting van

PITUITRINE.

Uitgebreider waarnemingsreeksen daaromtrent zijn evenwel tot dusverre niet gepubliceerd, zoodat wij van het verdere verloop weinig weten. Daarom heb ik een aantal proeven ondernomen, zoowel kort- als langdurige, om omtrent dit beloop eenige nadere gegevens te verkrijgen. De resultaten waren als volgt:

Konijnen, niet gevast. Elk dier $\frac{1}{2}$ cc Pituitrine Parke, Davis & Co. subcutaan. Interval steeds 10'. Onderzoek van *plasma*:

Proef 34.

Konijn 2100 Gr., manlijk.

10 Januari 1929:

Totale bls.	3.03	2.93	3.18	2.86	2.57
Vrije bls.	1.64	1.75	1.64	1.61	1.29
Hy-S	1.39	1.18	1.54	1.25	1.28
		-0.21	+0.15	-0.14	-0.11

Proef 35.

Konijn 2100 Gr., manlijk.

18 Januari 1929:

Totale bls.	1.64	1.68	1.61	1.61	1.61	1.86	1.75
Vrije bls.	1.43	1.39	1.28	1.28	1.61	1.68	1.64
Hy-S	0.21	0.29	0.33	0.33	0	0.18	0.11
		+0.08	+0.12	+0.12	-0.21	-0.03	-0.10

Proef 36.

Konijn 2150 Gr., manlijk.

19 Januari 1929:

Totale bls.	1.96	2.10	2.04	2.00	1.78	1.78	1.96
Vrije bls.	1.25	1.21	1.18	1.18	1.11	1.04	0.97
Hy-S	0.71	0.89	0.86	0.82	0.67	0.74	0.99
		+0.18	+0.15	+0.11	-0.04	+0.03	+0.28

Proef 37.

Konijn 2250 Gr., manlijk.

29 Januari 1929:

Totale bl.s.	2.21	2.10	2.07	2.07	1.93	2.00	1.75
Vrije bl.s. .	1.53	1.25	1.07	1.25	1.32	1.21	1.25
Hy-S	0.68	0.85	1.00	0.82	0.61	0.79	0.50
		+0.17	+0.32	+0.14	-0.07	+0.11	-0.18

Proef 38.

Konijn 2500 Gr., manlijk.

30 Januari 1929:

Totale bl.s.	2.07	2.00	1.96	2.03	2.14	1.82	1.89
Vrije bl.s. .	1.36	1.25	1.11	1.00	1.25	1.14	1.11
Hy-S	0.71	0.75	0.85	1.03	0.89	0.68	0.78
		+0.04	+0.14	+0.32	+0.18	-0.03	+0.07

Proef 39.

Konijn 2500 Gr., manlijk.

5 Februari 1929:

Totale bl.s.	2.32	2.07	2.32	1.96	2.07	1.71	2.18
Vrije bl.s. .	1.39	1.28	1.14	1.25	1.32	1.11	1.18
Hy-S	0.93	0.79	1.18	0.71	0.75	0.60	1.00
		-0.14	+0.25	-0.22	-0.18	-0.33	+0.07

Resultaat: .	-0.21	+0.15	-0.14	-0.11			
	+0.08	+0.12	+0.12	-0.21	-0.03	-0.10	
	+0.18	+0.15	+0.11	-0.04	+0.03	+0.28	
	+0.17	+0.32	+0.14	-0.07	+0.11	-0.18	
	+0.04	+0.14	+0.32	+0.18	-0.03	+0.07	
	-0.14	+0.25	-0.22	-0.18	-0.33	+0.07	

Gemiddeld: +0.02 +0.19 +0.05 -0.07 -0.05 +0.03

Konijnen, niet gevast. Elk dier $\frac{1}{2}$ cc Pituitrine Parke, Davis & Co. subcutaan. Intervallen 30—40'. Onderzoek van *plasma*:

Proef 40. Intervallen 30'.

Konijn 2150 Gr., manlijk.

16 November 1928:

Totale bl.s.	2.26	2.61
Vrije bl.s. .	1.75	2.25
Hy-S	0.51	0.36
		-0.15

Proef 41. Intervallen 40'.

Konijn 2300 Gr., manlijk.

20 November 1928:

Totale bl.s.	2.57	2.34	2.39	2.09	2.07	2.03	2.00
Vrije bl.s. .	2.14	1.75	1.46	1.44	1.32	1.30	1.39
Hy-S	0.43	0.59	0.93	0.65	0.75	0.73	0.61
		+0.16	+0.50	+0.22	+0.32	+0.30	+0.18

Proef 42. Intervallen 40'.

Konijn 2200 Gr., manlijk.

17 April 1929:

Totale bl.s.	2.00	2.00	2.07	1.96	1.82	1.93	1.89
Vrije bl.s. .	1.78	1.82	1.64	1.60	1.36	1.36	1.32
Hy-S	0.22	0.18	0.43	0.36	0.46	0.57	0.57
		-0.04	+0.21	+0.14	+0.24	+0.35	+0.35

Proef 43. Intervallen 40'.

Konijn 1950 G., manlijk.

26 April 1929.:

Totale bl.s.	1.96	1.68	1.78	1.68	1.86	1.68	1.89
Vrije bl.s. .	1.50	1.46	1.54	1.25	1.28	1.50	1.39
Hy-S	0.46	0.22	0.24	0.43	0.58	0.18	0.50
		-0.24	-0.22	-0.03	+0.12	-0.28	+0.04

Resultaat: . -0.15

	+0.16	+0.50	+0.22	+0.32	+0.30	+0.18
	-0.04	+0.21	+0.14	+0.24	+0.35	+0.35
	-0.24	-0.22	-0.03	+0.12	-0.28	+0.04

Gemiddeld: -0.07 +0.16 +0.11 +0.23 +0.09 +0.19

Men ziet, dat mijn proeven die van CONDORELLI enz. bevestigen: na een aanvankelijke stijging van het Hy-S-gehalte ziet men na ongeveer 40—50' inderdaad bijna steeds een kortdurende daling tot beneden de norm optreden, waarna echter opnieuw een, nu veel langduriger, stijging tot ver boven de norm optreden kan. Derhalve moet men m.i. het pituitrine als voor ons doel — het verwekken van een *langdurige* Hy-S-daling — onbruikbaar beschouwen.

Hoewel niet direct tot ons onderwerp behoorend, mogen toch nog enkele hier waargenomen feiten medegedeeld worden,

daar ik ze tot dusverre nog nergens elders vermeld vond. Ten eerste dat, zooals uit de verkorte protocollen blijkt, in strijd met de gangbare meening, pituitrine-Parke-Davis nagenoeg regelmatig een *daling* van het *vrije*-suikergehalte van het bloed bewerkte. Ten tweede is het merkwaardig, dat men juist na injectie van pituitrine, en niet na die van insuline of adrenaline, in de buizen, zoowel in die welke de onverwerkte vrije-bloedsuikerbepalingen als in die welke de hydrolysaten bevatten, zoo vaak eigenaardige boterachtige massa's ziet drijven, terwijl anders het eiwitneerslag steeds naar den bodem zakt. Blijkbaar „doet” toch inderdaad het pituitrine iets t.o.v. de in vivo aanwezige vetten of lipoiden, maar waarin deze werking bestaat, zal later onderzoek moeten leeren.

Op gelijke wijze heb ik ook de werking van het

ADRENALINE

seriesgewijze vervolgd, daar ook hiervan beweerd is, dat het het Hb-S-gehalte van het bloed resp. plasma verlagen zou. Hier volgen de verkorte protocollen:

Adrenaline, 1 mgr. subcutaan bij niet-vastende dieren. Intervallen 40'. Plasma.

Proef 44.

Konijn 2460 Gr., vrouwelijk.

8 Januari 1929:

Totale bls.	2.11	3.50	3.21	4.18	4.29	3.46	2.28
Vrije bls. .	1.14	3.11	3.00	2.46	2.57	2.43	1.93
Hy-S	0.97	0.39	0.21	1.72	1.72	1.03	0.35
		-0.58	-0.76	+0.75	+0.75	+0.06	-0.62

Proef 45.

Konijn 1850 Gr., vrouwelijk.

18 Februari 1929:

Totale bls.	1.78	2.64	2.68	3.00	2.92	1.96	1.75
Vrije bls. .	1.64	2.64	2.82	2.82	1.61	1.32	0.93
Hy-S	0.14	0	-0.14	0.18	1.31	0.64	0.82
		-0.14	-0.28	+0.04	+1.17	+0.50	+0.68

Proef 46.

Konijn 2250 Gr., vrouwelijk.

20 Februari 1929:

Totale bl.s.	1.71	2.78	3.75	3.93	4.00	2.64	2.86
Vrije bl.s. .	1.46	3.72	4.47	3.90	2.71	2.32	1.86
Hy-S	0.25	-0.94	-0.72	0.03	1.29	0.32	1.00
		-1.19	-0.97	-0.22	+1.04	+0.07	+0.75

Proef 47.

Konijn 2020 Gr., mannelijk.

22 Februari 1929:

Totale bl.s.	2.07	4.18	5.30	4.82	4.65	4.36	4.11
Vrije bl.s. .	2.07	4.00	4.68	4.25	3.93	3.97	3.65
Hy-S	0	0.18	0.62	0.57	0.72	0.39	0.46
		+0.18	+0.62	+0.57	+0.72	+0.39	+0.46

Proef 48.

Konijn 2300 Gr., vrouwelijk.

26 Februari 1929:

Totale bl.s.	1.86	4.11	5.04	5.14	4.79	4.50	3.93
Vrije bl.s. .	1.71	4.25	5.07	5.07	4.61	4.32	3.53
Hy-S	0.15	-0.14	-0.03	0.07	0.18	0.18	0.40
		-0.29	-0.18	-0.08	+0.03	+0.03	+0.25

Proef 49.

Konijn 2750 Gr., vrouwelijk.

28 Februari 1929:

Totale bl.s.	1.75	3.82	5.07	4.97	5.32	4.61	3.79
Vrije bl.s. .	1.53	3.68	4.86	4.93	4.68	4.18	3.46
Hy-S	0.22	0.14	0.21	0.04	0.64	0.43	0.33
		-0.08	-0.01	-0.18	+0.42	+0.21	+0.11

Proef 50.

Konijn 2050 Gr., mannelijk.

4 Maart 1929:

Totale bl.s.	1.89	4.15	4.29	4.00	3.97	3.68	2.75
Vrije bl.s. .	1.61	4.18	4.08	3.65	3.68	3.19	2.35
Hy-S	0.28	-0.03	0.21	0.35	0.29	0.49	0.40
		-0.31	-0.07	+0.07	+0.01	+0.21	+0.12

Resultaat:	—0.58	—0.76	+0.75	+0.75	+0.06	—0.62
	—0.14	—0.28	+0.04	+1.17	+0.50	+0.68
	—1.19	—0.97	—0.22	+1.04	+0.07	+0.75
	+0.18	+0.62	+0.57	+0.72	+0.39	+0.46
	—0.29	—0.18	—0.08	+0.03	+0.03	+0.25
	—0.08	—0.01	—0.18	+0.42	+0.21	+0.11
	—0.31	—0.07	+0.07	+0.01	+0.21	+0.12
Gemiddeld:	—0.34	—0.24	+0.14	+0.59	+0.21	+0.25

Men ziet: ook adrenaline bewerkt in den aanvang in den regel een daling van de Hy-S, die weliswaar langer aanhoudt dan de door pituitrine veroorzaakte, maar na ten hoogste 2 uur toch ook overgaat in een aanzienlijke stijging. Ook adrenaline schijnt dus voor het door mij beoogde doel: — blijvende verlaging van het Hy-S-gehalte — onbruikbaar.

Verder wijs ik er op, dat in 5 van de 7 proeven in de eerste phase de Hy-S practisch *tot nul daalt* (een prachtig argument tegen die opposanten, die meenen, dat de Hy-S eenvoudig door ordinaire afbraakproducten van het eiwit gevormd wordt, en dus altijd in ongeveer gelijke hoeveelheid aanwezig zou moeten zijn na een bepaalde verwerkingsmethode), maar bovendien, dat in de proeven 45, 46, 48 en 50 zelfs negatieve Hy-S-waarden verkregen worden, in proef 46 tot —0.94 toe. Uit deze merkwaardige waarnemingen zal men moeten concludeeren, dat door de hydrolyse met zuur niet alleen geen meerdere reduceerende stof in vrijheid gesteld wordt, maar dat van de onder adrenaline-invloed sterk vermeerderde „vrije bloedsuiker” een opvallend groot deel door het zuur in niet-reduceerenden vorm overgaat, een verschijnsel, dat men bij zoo kortdurende hydrolyse bij chemisch zuivere glucose niet verwachten kan. De gevolgtrekking ligt voor de hand, *dat de bij adrenaline-hyperglykaemie in het bloed opgehoopte reduceerende stof althans voor een deel in het geheel geen glucose is.*

AANHANGSEL.

DE GEBONDEN SUIKER IN ORGANEN.

Veel meer nog dan in bloed, zijn ook in de parenchymateuse organen stoffen aanwezig, die na hydrolyse met zuren reduceerende splitsingsproducten opleveren. In de eerste plaats moet men dan natuurlijk aan het glycogeen denken, en stilzwijgend heeft men soms aangenomen, dat dit de eenige stof was, die praktisch in aanmerking kwam. Nu bestaan gelukkig de op het principe van PFLÜGER gebaseerde methoden voor quantitative bepaling van het glycogeen alleen, zoodat men 't gehalte hieraan ook langs anderen weg vaststellen kan. En dan blijken soms tusschen de resultaten van beide methoden divergenties te bestaan, die allermintst toevallig kunnen zijn en wel degelijk op 't bestaan in groote hoeveelheden van nog een of meer stoffen met reduceerend hydrolyseproduct wijzen. Dit laatste is dan de Hy-S der organen, die dus verkregen wordt door van 't uit de reductie van 't hydrolysaat als „glucose” berekende „totaal-suiker”-gehalte en 't reductievermogen van 't glycogeen na hydrolyse, en 't vrije weefsel-suikergehalte af te trekken.

Allereerst zullen wij in 't kort aangeven, hoe wij zelf deze verschillende bepalingen (steeds in 2 à 3-voud) uitgevoerd hebben.

- 1°. De *hydrolyse van organen*. Hiertoe gebruikten wij aan één zijde toegesmolten glazen buizen van dezelfde soort als vroeger beschreven (blz. 28), maar zonder de daar genoemde vernauwing, en $\pm$ 25 cm. lang. Deze buizen werden nauwkeurig tot op centigrammen gewogen, nadat er met een diamant een herkenningsteeken op gekrast was. Vervolgens werd 't te hydrolyseeren orgaan met een scherp schaartje zoo snel mogelijk na 't uit het lichaam nemen fijngeknipt en van de brij snel in minstens 2 buizen elk $\pm$ 1 gram nauwkeurig afgewogen. Daarna ook hier toevoeging van 3 cc $\frac{2}{3}$ N.H₂SO₄ en 1 cc

aq. dest. per buis, waarna deze vlak bij 't open einde dichtgesmolten werd. Na bekoelen werd de inhoud krachtig geschud, om alle deeltjes aan allen kant met 't zuur in aanraking te brengen; zoo werden alle buizen achtereenvolgens verzameld, en ten slotte alle te zamen in één keer op de bekende wijze gehydrolyseerd. Als de hydrolyse afgeloopen was, werden de buizen, warm nog, uit den autoclaaf genomen en wederom krachtig geschud: daarbij vallen onmiddellijk alle weefselstukjes tot gelijkmatige brij uiteen. Dan laat men het nog eenigen tijd, 10' bij voorbeeld, staan opdat alles zich gelijkmatig over vloeistof en partikels verdeelen kan, en voegt daarna kwiknitraat etc. toe. De verdere verwerking is geheel als boven omschreven (zie blz....).

- 2°. De bepaling van het *glycogeen* geschiedde in principe volgens de methode van GOLDFEDEROVA (aangegeven in *Laufberger* 70).
- 3°. De vrije weefselsuiker werd bepaald door eenvoudig weefselstukjes direct in een getareerd kroesje met ijskoude alcohol te laten vallen, opnieuw snel te wegen, dan op te koken, den alcohol nog eenige malen nadat 't broos geworden weefsel fijn gemaakt is, te ververschen, op een bepaald volumen te brengen en ten slotte van de vloeistof 't gehalte aan reduceerende stof te bepalen volgens de bekende methode HAGEDORN—JENSEN in de modificatie-DRESEL & ROTHMANN.

Ook de bloedsuiker werd bij deze proefreeks (steeds in triplo) bepaald volgens HAGEDORN—JENSEN.—DRESEL & ROTHMANN, omdat voor deze methode de kleinste hoeveelheid bloed noodig is, en 't zaak was, bij onze proefdieren elk overbodig bloedverlies te vermijden.

Om de onderlinge verhoudingen en het beloop van bloedsuiker, leverglycogeen en leversuiker gelijktijdig bij één en 't zelfde dier te kunnen bepalen en zelfs van tijd tot tijd te kunnen vervolgen, gebruikten wij de *afschroefbare buikvensters* volgens CORI (38).

Elders (55) hebben wij reeds uiteengezet, welke waarde men aan bovengenoemde methode hechten kan en wat 't effect is van den ingreep als zoodanig. Daarop behoeven we dus niet nader terug te komen, en wij kunnen direct de verkregen resultaten nader beschouwen.

Gebruikt werden steeds konijnen, die in aansluiting aan de operatie 4 dagen gevestigd hadden en alleen dan voor de proef dienden, wanneer ze in goede conditie waren. Het is overigens opmerkelijk, hoe weinig de dieren zich van het dragen van 't venster en het vasten aantrekken; ze gedragen zich vrijwel als ieder ander konijn.

Bij elke proef werden eerst de normaalwaarden voor bloedsuiker, vrije leversuiker, leverglycogeen en lever-Hy-S bepaald; dan werd de stof, welks invloed onderzocht zou worden, subcutaan ingespoten, en 2 en 4 uur daarna weer dezelfde reeks van bepalingen uitgevoerd (steeds met medewerking van eenige anderen, om alles zoo snel mogelijk na 't uitnemen te kunnen verwerken). Ook werd regelmatig de temperatuur der dieren gecontroleerd, omdat deze de beste aanwijzing geeft omtrent hun klinischen toestand. Alle bepalingen geschieden in duplo, de bepalingen van de vrije bloedsuiker volgens HAGEDORN—JENSEN—DRESEL—ROTHMANN zelfs in drievoud, om alle risico uit te sluiten. Het resultaat van deze proefreeks vatten we samen in de uitslaande tabel A.

(N.B. De nummers der proeven correspondeeren *niet* met die in de voorafgaande tabellen!):

Wat leert ons nu deze tabel?

Ten eerste: *Dat als 't lever-Hy-S-gehalte, als glucose berekend, bij 't begin der proef, bij de 4 dagen vastende dieren opvallend laag is, het glycogeengehalte opvallend hoog is, en omgekeerd.*

B.v. no	50	Gebonden leversuiker	0.90 ‰	glycogeen	11.20 ‰
"	64	"	0.71 "	"	5.40 "

Daartegenover vindt men bij

no	44	Gebonden leversuiker	5.51 ‰	glycogeen	0.25 ‰
"	45	"	8.68 "	"	0.42 "
"	49	"	19.65 "	"	0.75 "
"	54	"	11.04 "	"	0.85 "
"	62	"	7.16 "	"	0.40 "

en ook de overige proeven sluiten zich aan bij deze laatste groep. Van de 16 proeven is er slechts één (n° 59) waar èn glycogeen, èn Hy-S-gehalte beide hoog zijn. Uit dit alles mag men wel concludeeren, *dat er een zekere relatie, en zelfs een zekere reciprociteit bestaat tusschen het leverglycogeen eenerzijds en de lever-Hy-S anderzijds*, hoe vaag de definitie van deze laatste ook mogen wezen. Daarbij blijft het een open vraag, of beide stoffen direct met elkaar in verband staan, dan wel beide afstammen van een derde, nog onbekende, grondsubstantie welks physiologische omzetting in 't eene individu meer naar de eene, in 't andere meer naar de andere zijde verloopt. In dertien van de zestien gevallen vonden wij dus

bij onze hongerdieren een hoog lever-Hy-S-gehalte tegen een laag glycogeengehalte: blijkbaar is dit dus de „physiologische” verhouding in deze omstandigheden.

De lever-Hy-S blijkt ook inderdaad intensief deel te nemen aan de chemische omzettingen in het lichaam, zooals de serieproeven bij één en 't zelfde individu aantoonen (iets wat eerst door de buikvenstermethode van CORI mogelijk geworden is!). In een reeks van gevallen ziet men 't gebonden-suiker-gehalte toenemen (nos 44, 48, 50, 61, 62, 63, 64), soms zelfs zeer aanzienlijk (nos 54, 58, 60); daartegenover staan andere gevallen, waar in de enkele uren, welke de proef duurde, enorme dalingen plaats hadden (nos 46, 47, 48, 49, 59, 60); een enkele maal ziet men achtereenvolgens sterke uitslagen in tegenovergestelden zin bij één en 't zelfde individu (nos 54, 60). Geen twijfel dus, dat wij hier met *een uiterst belangrijk stofwisselingsproduct* (of wellicht een groep van meerdere componenten) te doen hebben.

Dit blijkt ook, als men de quantitatieve verhoudingen t.o.v. het glycogeen bij deze 4 dagen vastende konijnen nagaat. Meermalen *is bij deze dieren het Hy-S-gehalte in de lever, als glucose berekend, ongeveer twintig malen zoo hoog als het glycogeengehalte!* (nos 44, 45, 46, 62), eenmaal zelfs ruim zes en twintig maal (n° 49)! Duidelijker kan men wel niet aantoonen, *hoe men zich tot dusverre blind staarde op het glycogeen*, en een blijkbaar minstens even belangrijke stof verwaarloosd heeft.

Wat de quantitatieve veranderingen van beide betreft, willen wij er op opmerkzaam maken, dat onder sommige omstandigheden bij één bepaald individu *en de Hy-S en 't glycogeen tegelijk kunnen toenemen* (nos 44, 58, 60), wat er op zou kunnen wijzen, dat niet eenvoudig de eene stof in de andere overgaat, maar dat beide uit een reserve elders in het lichaam putten. Dat beide ook vaak tegelijk afnemen is een feit van veel minder belang.

Van de mogelijkheid, de lever-Hy-S pharmacologisch te beïnvloeden is ons tot dusver weinig gebleken. Insuline althans (toentertijd nog zeer onzuiver) had, blijkens onze tabel, geen duidelijk effect in één bepaalde richting. Men zal

zich er misschien over verbazen, dat in de proeven nos 46 t/m 50, na kleine doses insuline, niets van de vroeger door ons beschreven geringe toename van het glycogeen-gehalte te zien is: dit zal o.i. daarvan afhangen, dat bij de thans besproken proeven de ingreep zooveel grooter was, doordat hier telkenmale voor elke serie bepalingen 6,32 à 20,32 gram lever geëxstirpeerd werd, tegen nauwelijks 2 gram bij onze vroegere proeven. Dat blijkt ook wel uit 't klinisch gedrag dezer dieren (3 van de 5 dieren binnen 4 uur gestorven, de beide overige ook niet in goede conditie bij 't eind der proef); voor onze proeven hindert dit echter weinig, omdat de hier essentiele feiten er des te scherper door uitkomen.

De resultaten van dit deel van mijn onderzoek samenvattend, meen ik te mogen concludeeren, dat in de lever naast het glycogeen nog een andere stof voorkomt, die eveneens bij hydrolyse met zuur een reduceerend product levert, en die quantitatief zich des te meer op den voorgrond dringt, naarmate de hoeveelheid glycogeen afneemt. Ook deze Hy-S bleek binnen korten tijd aanzienlijk te kunnen toe- of afnemen.

Samenvatting van het eigen onderzoek.

De in de voorafgaande bladzijden beschreven proeven bevestigden, dat bloed na verhitting met verdund zuur (hydrolyse) en zoo volledig mogelijke verwijdering der stikstofhoudende eiwit-afbraakproducten een hooger reduceerend vermogen t.o.v. alkalische cuprizout-oplossingen vertoont dan zonder deze hydrolyse. Tevens kon ik aantoonen dat deze toename van het reduceerend vermogen *niet* berust op het vrijkomen van stoffen die uit ieder eiwit te verkrijgen zijn, want ten eerste vertoonden diverse eiwitten (kippeneiwit, caseïne) een nauwelijks merkbare toename, en ten tweede bleek in bloed-plasma hun gehalte, onder invloed van adrenaline bijvoorbeeld, acuut tot nul te kunnen dalen, terwijl het plasma toch zeker niet zijn geheele eiwitgehalte verloren zal hebben.

Helaas bleek het buitengewoon moeilijk, iets naders om-

trent de chemische natuur van de afgesplitste reduceerende stof vast te stellen: wel scheen het mij toe, dat het hier niet om één, maar om een groep van stoffen gaat. In strijd met de gangbare meening geloof ik, dat glucose, zoo ze er al deel aan heeft, slechts een — quantitatief althans — zeer ondergeschikte rol speelt; ook omtrent het voorkomen van galactose, mannose e.d. kon ik geen zekerheid krijgen, al schijnt speciaal met 't oog op laatstgenoemde suiker nader onderzoek wel gewenscht. Hetzelfde geldt voor triosen, pentosen, aminosuikers en glycuronzuur: van geen van allen kon ik een noemenswaarde hoeveelheid in de hydrolysaten vinden. Daarentegen bleek mij, dat een deel der stoffen in kwestie vluchtig is. De door sommigen als gids gebruikte Molisch-reactie bleek mij bij dit werk geheel onbruikbaar, daar ze zeer sterk kan zijn in hydrolysaten, die in 't geheel niet reduceeren, en ook in niet-reduceerende destillaten voorkomt.

In welke binding de reduceerende stof vóór haar afsplitsing opgenomen was, bleef uiteraard eveneens duister: wel kon ik de meening van CONDORELLI bevestigen, dat de hydrolyseerbare stof zich bij uitzouten van bloedplasma met ammonium-sulfaat in de globuline-fractie bevindt, maar, daar ze soms ten deele met verdunden alcohol extraheerbaar bleek, maakt ze toch waarschijnlijk geen integreerend bestanddeel van het globuline-molecuul uit. Pogingen, om uit bloed eenige der reeds bekende complexe suikerverbindingen (glycogeen, dextrinen, hexosephosphaten, glucosaminomannose, galactolipinen, gepaarde glycuronzuren, mucoid) te isoleeren, hadden slechts zeer matig of in 't geheel geen succes: van geen van allen kreeg ik den indruk, dat ze een ook maar eenigszins belangrijke rol spelen. Bij aanwezigheid van biosen (lactose, maltose, isomaltose) hadden de hydrolysaten herkenbare hoeveelheden phenylglucosazon of galactosazon moeten opleveren: daarvan bleek niets, dus mag men m.i. ook hun tegenwoordigheid in eenigermate belangrijke hoeveelheid wel uitsluiten. Ten slotte bleek in enkele gevallen de afgesplitste reduceerende stof ook bij kamertemperatuur reeds reduceerend te werken.

Dat het door hydrolyse met zuur afsplitsbare reduceerende materiaal in het bloedplasma geen indolent bestanddeel is, maar integendeel ten nauwste bij de stofwisseling betrokken is, bewijzen mijn proeven met enkele hormonpreparaten, die, mits ze van voldoende zuiverheid waren, zeer regelmatige veranderingen bleken te bewerken. De in de literatuur tot dusver daaromtrent verschenen opgaven waren zeer tegenstrijdig: daarom beperkte ik mij niet tot een enkele bepaling na de toediening van het hormon, maar verrichtte bij elk dier met vaste tusschenpoozen een gansche reeks van bepalingen. De uitkomsten daarvan waren de volgende: *Pituitrine*-inspuiting bewerkt regelmatig eerst een stijging, en dan na 30—40 minuten een zeer kortdurende daling van het gehalte aan gebonden reduceerend materiaal, die snel voorbijgaat en plaats maakt voor een hernieuwde, langdurige, stijging. *Adrenaline* bewerkt meestal in den aanvang een vrij langdurige daling, vaak tot nul, die vervolgens steeds voor een langdurige stijging plaats maakt. *Insuline* in zijn zuiversten tot dusver bekenden vorm veroorzaakt regelmatig een langdurige stijging; bij onzuivere preparaten is het effect wisselvallig, blijkbaar doordat deze naast het verhoogende insuline een verlagend agens als verontreiniging bevatten. Inderdaad gelukte het, de scheiding van deze beide tot stand te brengen en de stof, die een langdurige daling bewerkt — zij het ook waarschijnlijk nog in onzuiveren vorm — te isoleeren. De kennis van dergelijke, het gehalte van het plasma aan hydrolyseerbare, een reduceerend product leverende stoffen (door mij korthedshalve Hy-S genoemd) verlagende stoffen kan wellicht in de toekomst van eenig belang worden, daar uit de onderzoekingen van anderen bekend is, dat juist bij eenige belangrijke pathologische processen (carcinoom, tuberculose, uraemie) het gehalte van het bloed aan genoemde Hy-S verhoogd is, ofschoon men thans nog niet weet, of deze identiek is met de in normale omstandigheden aanwezige.

Ten slotte heb ik aangetoond, dat, behalve in het bloed, ook in organen, met name in de lever, naast het glycogeen een Hy-S aanwezig is, welks hoeveelheid ook binnen korten

tijd in aanzienlijke schommeling gebracht kan worden. Op den langen duur scheen een zekere reciprociteit tusschen glycogeen-gehalte en Hy-S-gehalte zich in te stellen, zoodat, wanneer het eerste laag is, men het tweede hoog vindt en omgekeerd. Quantitatief is het Hy-S-gehalte van de lever, als glucose berekend, vaak veel grooter dan het glycogeengehalte, althans onder bepaalde physiologische omstandigheden.

Resumeerend, meen ik te mogen zeggen, dat wij hier te doen hebben met een bloedbestanddeel, waaraan tot dusver veel te weinig aandacht geschonken is.

Het is dan ook geenszins mijn bedoeling, dit proefschrift als een afsluiting van mijn taak te beschouwen: veeleer hoop ik naderhand in staat te zijn, het onderzoek in verschillende richtingen nog voort te zetten, niet alleen in de breedte, maar bovenal in de diepte.

LITERATUUR.

1. BANG, I., & J. FORSMANN, Hofmeister's Beiträge **8**, 238, 1906.
2. BARRE, J. la, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **113**, 368, 1926
3. BIERRY, H., C.-R. Acad. d. Sciences **169**, 1112, 1919.
4. BIERRY, H., C.-R. Soc. de Biol. **98**, 431, 1928.
5. BIERRY, H. & L. FANDARD, C.-R. Acad. d. Sciences **158**, 61, 1914.
6. BIERRY, H. & L. MOQUET, C.-R. Soc. de Biol. **90**, 1316, 1914.
7. BIERRY, H. & A. RANC, C.-R. Acad. d. Sciences **158**, 278, 1914.
8. BIERRY, H. & A. RANC, C.-R. Soc. de Biol. **77**, 386, 1914.
9. BIERRY, H. & F. RATHERY, C.-R. Acad. d. Sciences **172**, 1445, 1921.
10. BIERRY, H. & F. RATHERY, Presse méd. 1927 II, 1177.
11. BIERRY, H., F. RATHERY, & F. BORDET, C.-R. Acad. d. Sciences **174**, 970, 1922.
12. BIERRY, H., F. RATHERY & R. KOURILSKY, C.-R. Soc. de Biol. **90**, 36, 1924.
13. BIERRY, H., F. RATHERY & L. LEVINA, C.-R. Acad. d. Sciences **173**, 56, 1921.
14. BIERRY, H., F. RATHERY & L. LEVINA, C.-R. Soc. de Biol. **86**, 1135, 1922.
15. BISCEGLIE, V., Clin. med. ital. **56**, 215, 1925, gecit. vlg. Ber. Physiol. **34**, 841, 1926.
16. BORDET, F., Thèse de Paris 1922.
17. BRIGGS, A. P., Journ. Biol. Chem. **53**, 13, 1922.
18. BRUGI, A., Minerva medica **5**, No. 25 (10 Sept. 1925).
19. CALTABIANO, D., Sicilia sanitaria **4**, No. 2/3, 1925.
20. CALTABIANO, D., Ibid. **4**, No. 12, 1926.
21. CAMMIDGE, P. J., Brit. med. Journ. 1923 I, 787.
22. CAMMIDGE, P. J., Lancet 1927 II, 1356.
23. CAMMIDGE, P. J. & H. A. H. HOWARD, NEW VIEWS ON DIABETES MELLITUS. London, Hodder & Stoughton 1923.
24. CHAHOVITCH, X., & V. ARNOVLJEVITCH, C.-R. Soc. de Biol. **96**, 1010, 1927.
25. CONDORELLI, L., Annal. di Clin. Terap. 1924.
26. CONDORELLI, L., Ibid. 1925.
27. CONDORELLI, L., Ibid. 1926.
28. CONDORELLI, L., Boll. Accad. Med. di Roma **50**, 97, 1924.
29. CONDORELLI, L., Ibid. **50**, 378, 1924.

30. CONDORELLI, L., Ibid. **50**, 394, 1924.
31. CONDORELLI, L., Giorn. di Clin. Med. **5**, 10, 1924.
32. CONDORELLI, L., Osservat. Med. **1**, 1, 1923.
33. CONDORELLI, L., Policlinico, Sez. med., 1924, 125.
34. CONDORELLI, L., Ibid. **32**, 317, 1925.
35. CONDORELLI, L., Ibid. 1926.
36. CONDORELLI, L., Presse méd. 1927 II, 962.
37. CONTI, F., Minerva med. **7**, No. 7, 1927.
38. CORI, C. F., G. T. CORI & G. W. PUCHER, Journ. Pharmacol. & Exp. Therap. **21**, 377, 1923.
39. DISCHE, Z., Biochem. Ztschr. **74**, 201, 1928.
40. EMBDEN, G., Ztschr. f. physiol. Chem. **113**, 138, 1921.
41. FEULGEN, R., & K. IMHÄUSER, Biochem. Ztschr. **181**, 30, 1927.
42. FEULGEN, R., K. IMHÄUSER & M. WESTHUES, Ibid. **193**, 251, 1928.
43. FEULGEN, R., & K. VOIT, Pflüger's Arch. **206**, 389, 1924.
44. FISCHLER, F. & O. HIRSCH, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol. **127**, 287, 1928.
45. FRAENKEL, S. & C. JELLINEK, Biochem. Ztschr. **185**, 392, 1927.
46. FREUND, E. & G. KAMINER, BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN DER DISPOSITION FÜR CARCINOM. Wien, Springer 1925.
47. GABBE, E., Biochem. Ztschr. **187**, 57, 1927.
48. GABBE, E., Klin. Wochenschr. 1927 I, 1210.
49. GABBE, E., Ibid. 1927 II, 1974.
50. GABBE, E., Verhandl. d. deutsch. pharmakol. Ges. **7**, 49, 1928.
51. GLASSMANN, B., Ztschr. f. physiol. Chem. **158**, 113, 1926.
52. GOODWIN & ROBISON, Biochemical Journ. **18**, 1161, 1924.
53. GREVENSTUK, A., Asher-Spiro's Ergebnisse der Physiol. XXVIII, 1929; ÜBER FREIEN UND GEBUNDENEN ZUCKER IN BLUT UND ORGANEN, München, Bergmann 1929.
54. GREVENSTUK, A. & E. LAQUEUR, Asher-Spiro's Ergebnisse der Physiol. XXIII, 1. 1925; INSULIN, München, Bergmann 1925.
55. GREVENSTUK, A. & E. LAQUEUR, Biochem. Ztschr. **163**, 390, 1925.
56. IMHÄUSER, K., Klin. Wochenschr. 1927 II, 1495.
57. IMHÄUSER, K., Biochem. Ztschr. **186**, 360, 1927.
58. IMHÄUSER, K., Ibid. **193**, 416, 1928.
59. JACKSON, Journ. of Biol. Chem. **59**, 529, 1924.
60. KAMINER, G., DIE BIOCHEMIE DES CARCINOMS, Wien, Springer 1926.
61. LANGSTEIN, L., Asher-Spiro's Ergebnisse der Physiol. **1**, I, 63, 1902.
62. LANGSTEIN, L., Ibid. **3**, I, 453, 1904.
63. LANGSTEIN, L., Biochem. Ztschr. **127**, 34, 1922.
64. LANGSTEIN, L., Hofmeister's Beiträge **1**, 259, 1902.
65. LANGSTEIN, L., Ibid. **6**, 349, 1905.

66. LANGSTEIN, L., Monatshefte f. Chemie **24**, 445, 1903, gecit. vlg. Maly's Jahresber. **33**, 30, 1904.
67. LANGSTEIN, L., Monatshefte f. Chemie **25**, 453, 1904, gecit. vlg. Maly's Jahresber. **34**, 247, 1905.
68. LANGSTEIN, L., Monatshefte f. Chemie **26**, 531, 1905, gecit. vlg. Maly's Jahresber. **35**, 6, 1906.
69. LANGSTEIN, L., Sitzungsber. kaiserl. Akad. d. Wissensch. Wien, Mathem.-naturwissensch. Klasse, III. Abt. **114**, 18, 1906, gecit. vlg. Maly's Jahresber. **36**, 16, 1907.
70. LAUFBERGER, W., Klin. Wochenschr. 1924, I, 264.
LAUFBERGER, W., Ztschr. f. exp. Med. **42**, 570, 1924.
71. LAWACZECK, H., Biochem. Ztschr. **145**, 351, 1924.
72. LAWACZECK, H., Klin. Wochenschr. 1925 II, 1858.
73. LEAN, H. Mc., Lancet 1926 I, 1129.
74. LÉPINE, R., LE SUCRE DU SANG, Paris, Alcan 1921.
75. LÉPINE, R. & BOULUD, Archives internat. de Physiol. **14**, 91, 1914.
76. LÉPINE, R. & BOULUD, C.-R. Soc. de Biol. **68**, 260, 1910.
77. LÉPINE, R. & BOULUD, Ibid. **72**, 1064, 1912.
78. LÉPINE, R. & BOULUD, Ibid. **73**, 272, 1912.
79. LÉPINE, R. & BOULUD, Ibid. **74**, 76, 1913.
80. LÉPINE, R. & BOULUD, Journ. de Physiol. et de Pathol. génér. **11**, 557, 1909.
81. LÉPINE, R. & BOULUD, Ibid. **13**, 178, 1911.
82. LEVENE, P. A., HEXOSAMINES AND MUCOPROTEINS, London Longmans 1925.
83. MACLEAN, H. & I. S., LECITHIN AND ALLIED SUBSTANCES, THE LIPINS, 2nd Ed. London, Longmans 1927.
84. MARTENS, J. M. H. A., Dissertatie Amsterdam 1927.
85. MORITA, S., Tohoku Journ. of exp. Med. **3**, 279, 1922.
86. MÜLLER & SEEMANN, Deutsche mediz. Wochenschr. 1899, 209.
87. NEEDHAM, J., Biochemical Journ. **21**, 733, 1927.
88. NEUBERG, C., & M. KOBEL, Biochem. Ztschr. **185**, 477, 1927.
89. NITZESCU, I. I., & C. POPESCU-İNOTESTI, C.-R. Soc. de Biol. **89**, 1403, 1923.
90. OFFER, TH. E., Hofmeister's Beiträge **8**, 399, 1906.
91. PALOMBELLA, A. V., Rinnovamento med. 1927 No. 2.
92. PASCUCCI, O., Hofmeister's Beiträge **6**, 543, 1905.
93. PAVY, F. W., DIE PHYSIOLOGIE DER KOHLEHYDRATE, Leipzig u. Wien, Deuticke 1895.
94. PAVY, F. W., ÜBER DEN KOHLEHYDRATSTOFFWECHSEL, Leipzig, Engelmann 1907.
95. PAVY, F. W., Journ. of Physiol. **20**, Proceed. VII, 1896.
96. PAVY, F. W., Ibid. **24**, 479, 1899.

97. PAVY, F. W. & R. L. SIAU, Ibid. **26**, 282, 1901.
98. PAVY, F. W. & R. L. SIAU, Ibid. **27**, 457, 1902.
99. PHOCAS, A., C.-R. Soc. de Biol. **82**, 485, 1919.
100. RABINOWITCH, I. M., Journ. of Biol. Chem. **75**, 45, 1927.
101. RANDOIN-FANDARD, L., Thèse de Paris. Paris, Jouve & Cie., 1918.
102. RAPISARDI, Sicilia sanitaria **2**, No. 10/11, 1924, gecit. vlg. Condorelli (30).
103. SCOTT, D. A., & C. H. BEST, Amer. Journ. of Physiol. **68**, 144, 1924.
104. SIMONNET, H., Bull. de la Soc. de Chim. biol. **6**, 44, 1924.
105. STAUB, H., INSULIN, 2. Aufl. Berlin, Springer 1925.
106. STEPP, W., R. FEULGEN & K. VOIT, Biochem. Ztschr. **181**, 284, 1927.
107. TERADA, Y., Ibid. **145**, 426, 1924.
108. TOSCANO, C., Policlinico, Sez. med. 1927.
109. ULLMANN'S Enzyklopädie d. techn. Chemie **11**, 493, 1922.

Runderserum
+ ammoniumsulfat. } (Hy-S komt overeen met 755 mgr. Glucose).

neerslag = globuline
+ 60 % alcohol. } (Hy-S " " " 570 " ").

rest = globuline
+ 70 % alcohol. } 1^e extract
(Hy-S " " " 117 " ").

rest = globuline
+ 70 % alcohol. } 2^e extract
(Hy-S " " " 323 " ").

rest = globuline
+ 70 % alcohol. } 3^e extract
(Hy-S " " " 34 " ").

rest = globuline
+ 70 % alcohol. } 4^e extract
(Hy-S " " " 289 " ").
Verwerkt op glucosaminomannose
Opbrengst hoogstens sporen.

SCHEMA I.

Alcoholische extracten
vereenigd en in lucht-
stroom ingedampt tot
droog.

+ aceton

Acetonextract

residu
+ aether

Aetherextract

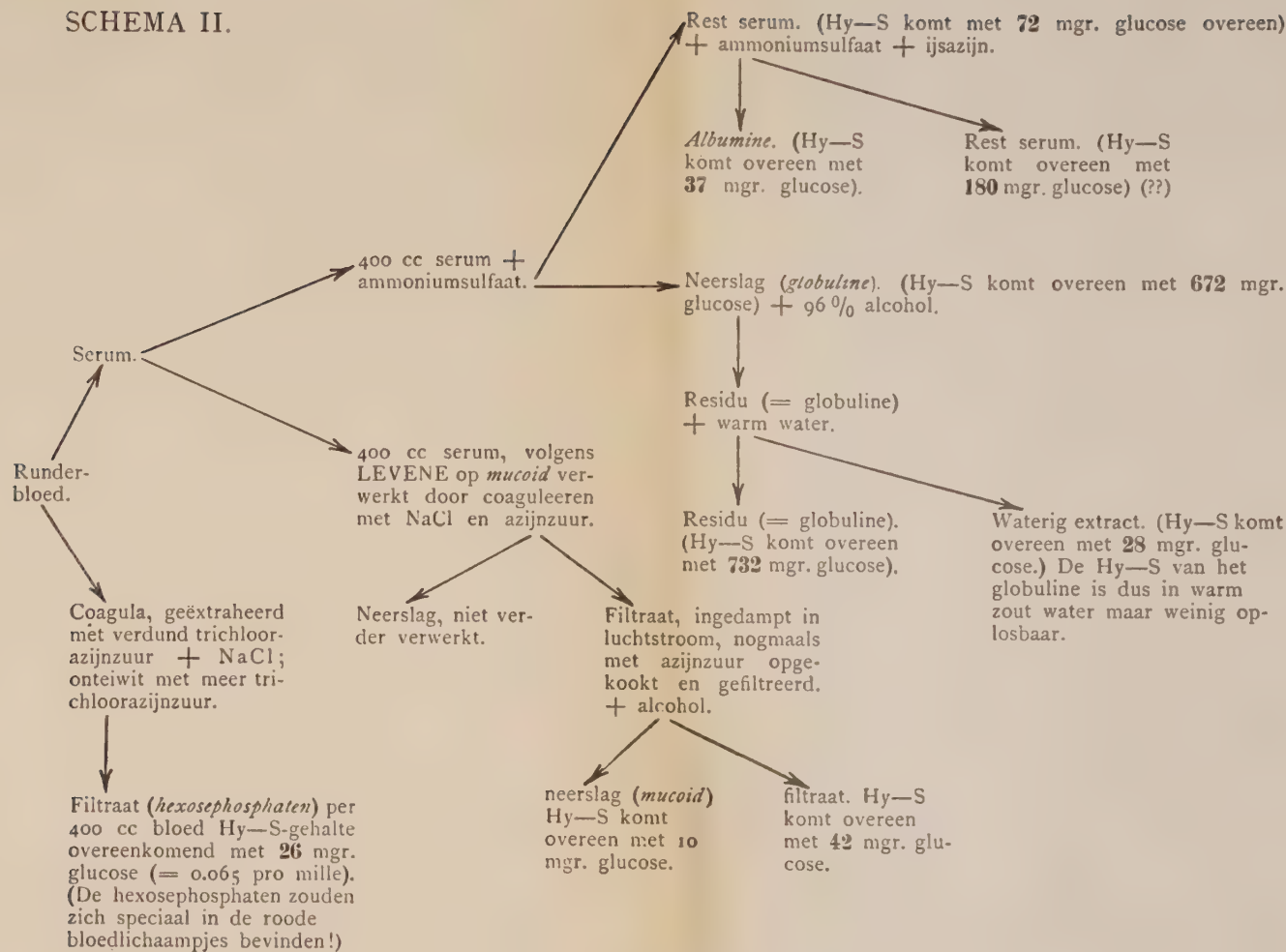
residu
+ pyridine

Pyridineëxtract
gehydrol. met HCl.
Met methylphenylhydrazine
troebeling, maar geen
kristallen.
Reductie spoor.

spoor residu
(zouten).

Vereenigd, ingedampt
tot droog, gehydrol.
met HCl. *Reduceert*
zeer sterk. Met methyl-
phenylhydrazine geen
kristallisatie.

SCHEMA II.



SCHEMA III.

Runderbloed → *Erythrocyten*, driemaal gewasschen met physiol. zoutopl.
Per cc. komt de Hy—S overeen met **0.77** mgr. glucose.

→ *Plasma*.
Per cc. komt de Hy—S overeen met **0.50** mgr. glucose.

+ magnesiumsulfaat

(neerslag
(= globuline)
Per cc. plas-
ma komt het
Hy—S-gehalte
overeen met
0.39 mgr. glu-
cose; *te lage*
waarden dus.

rest
plasma
Hy—S
nihil.

+ ammoniumsulfaat

neerslag (= globuline)

Per cc. plasma komt het
Hy—S-gehalte overeen met
1.54 mgr. glucose, *te*
hooge waarden dus, wel-
licht veroorzaakt, door-
dat bij aanwezigheid van
ammonium de reduceerende
eiwitafbraakproducten
door het kwik onvolledig
neergeslagen worden.
De globulinemassa geëx-
traheerd met 96 % alcohol.

rest plasma

Per cc. plasma
komt het Hy—S-
gehalte overeen
met **0.40** mgr.
glucose.

rest (= globuline + zout)
+ benzol → 96 % alcoholisch
extract.
Hy—S = 0

rest (= globuline + zout)
+ water → benzolextract.
Hy—S: spoor.

rest (= globuline)
(bevat nog zeer veel Hy—S)
+ water → waterig extract
Hy—S: spoor.

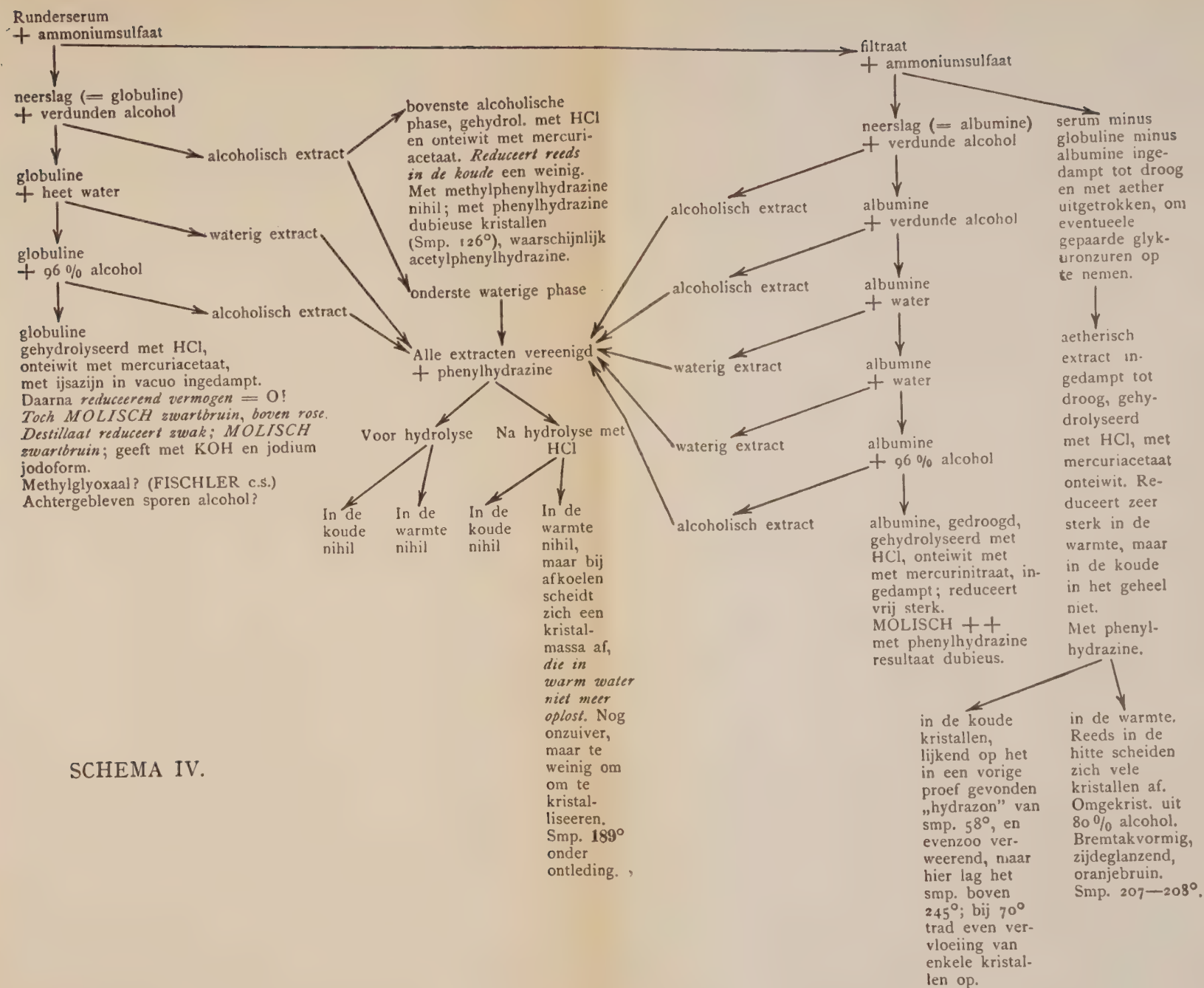
rest (= globuline) bevat nog
zeer veel Hy—S. Gehydrol.
+ water → waterig extract
Hy—S: spoor.

rest (= globuline) bevat nog
zeer veel Hy—S. Gehydrol.
met HCl, onteiwit met mercu-
riacetaat, ingedampt tot
droog: *caramelgeur*. Nogmaals
gehydroliseerd, onteiwit en met ijsazijn ingedampt.
Met methylphenylhydrazine nihil. Met phenylhydrazine in de
koude groote massa's lange fijne naalden, uiterst oplosbaar
in koud water. In de warmte ontstaan geen kristallen die zich
reeds in de warmte afzetten (*glucose dus afwezig*), maar wel
schieten bij bekoelen plaatjes en naalden uit, die weinig in
koud water oplossen. Driemaal omgekristalliseerd:
goudgele rosetten, smp. 129—130°. Op vermoeden, dat het dioxycetonosazon is,
omgekrist. uit warmen benzol: sneeuwwit, smp. nog steeds 129—130°. Acetylphenylhydrazin
heeft ongeveer hetzelfde smeltpunt, maar scheen ervan te verschillen door oplosbaarheid,
kristalvorm enz.; ook bleek dit niet aldus uit benzol kristalliseerbaar.

Smp. ongezuiverd
85—87°. Omgekrist.

a. Onoplosb. in koud
water. Smp. 127—130°.

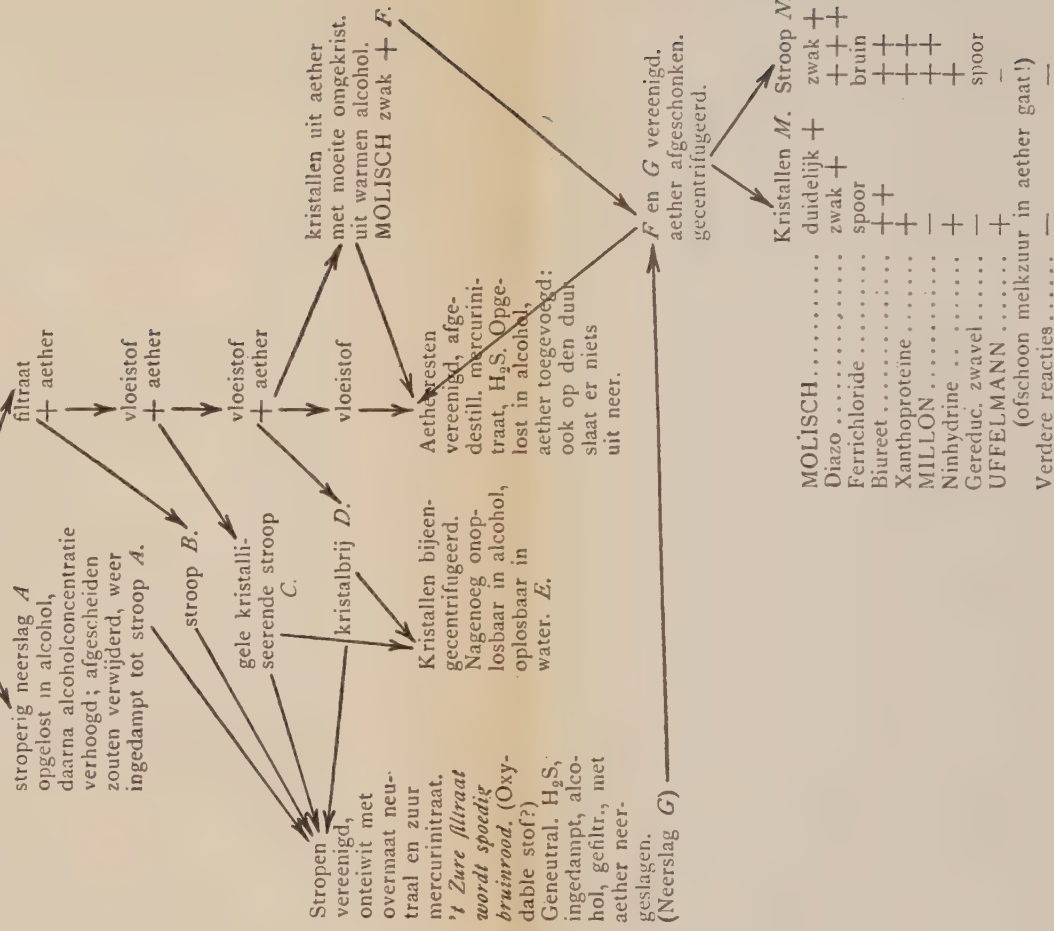
b. Oplosb. in koud
water. Weer ingedampt.
Kristallen verweeren.
Smp. onverweerde kris-
tallen 49—50°. Smp. ver-
weerde kristallen, ook
na omkristall. uit alco-
hol 55—59°; na omkrist.
in de hitte smp. 123—127°.



SCHEMA IV.

SCHEMA V.

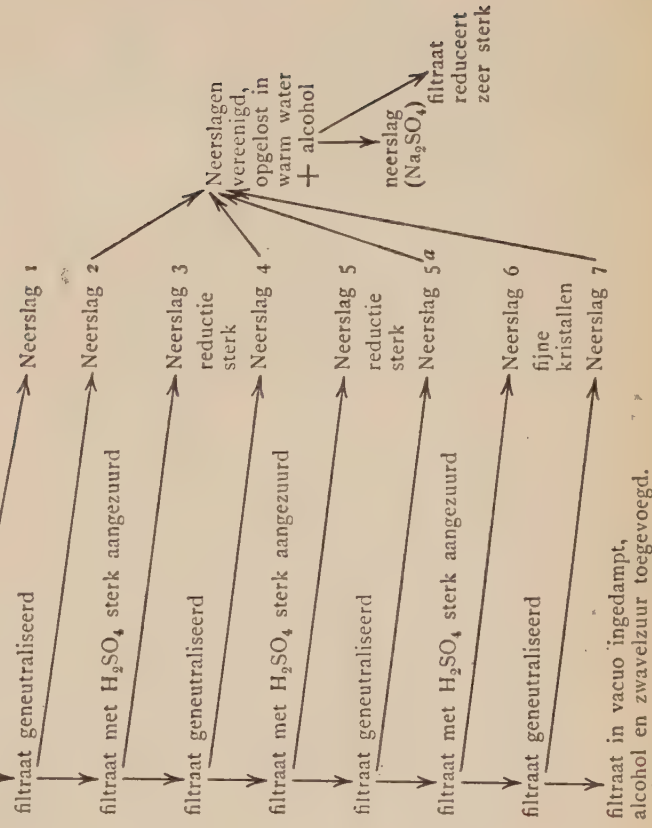
Bloedhydrolysaten, onteiwit met colloidaal ijzerhydroxyd. Alcohol, Zoutvrij filtraat in vacuo ingedampt, met mercurinitraat verder onteiwit, H_2S . Ingedampt. Reduceert sterk. Verdere isoelectrische zuivering door toevoeging van H_2SO_4 . Geneutraliseerd, zout afgeiltreid. In vacuo verder ingedampt. Overmaat alcohol erbij.



Kristallen M reduceren zeer sterk. Driemaal omgekrist., kristallen *N*-vrij, reductie nihil. Achtergebleven stroop sterk reducerend; bevat 6% *N* na drogen in vacuo boven CaCl_2 .

Bloedhydrolysaten, onteiwit met colloidaal ijzerhydroxyd. Alcohol. Zoutvrije filtraten vereenigd en met zwavelzuur aangezuurd.

SCHEMA VI.



filtraat + sterken alcohol en zwavelzuur

filtraat verder ingedampt, + mercurinitraatreagens in overmaat.

filtraat + sterken alcohol en zwavelzuur

filtraat verder ingedampt, + mercurinitraatreagens in overmaat.

filtraat grasgroen, na langdurig doorleiden van H₂S bleekgeel. In vacuo ingedampt. Met aether in koelcel.

Stroop.
Met phenylhydrazine eerst na maanden in koelcel kristallen (smp. 123—125°) waarvan N-gehalte veel te laag voor acetylphenylhydrazine.

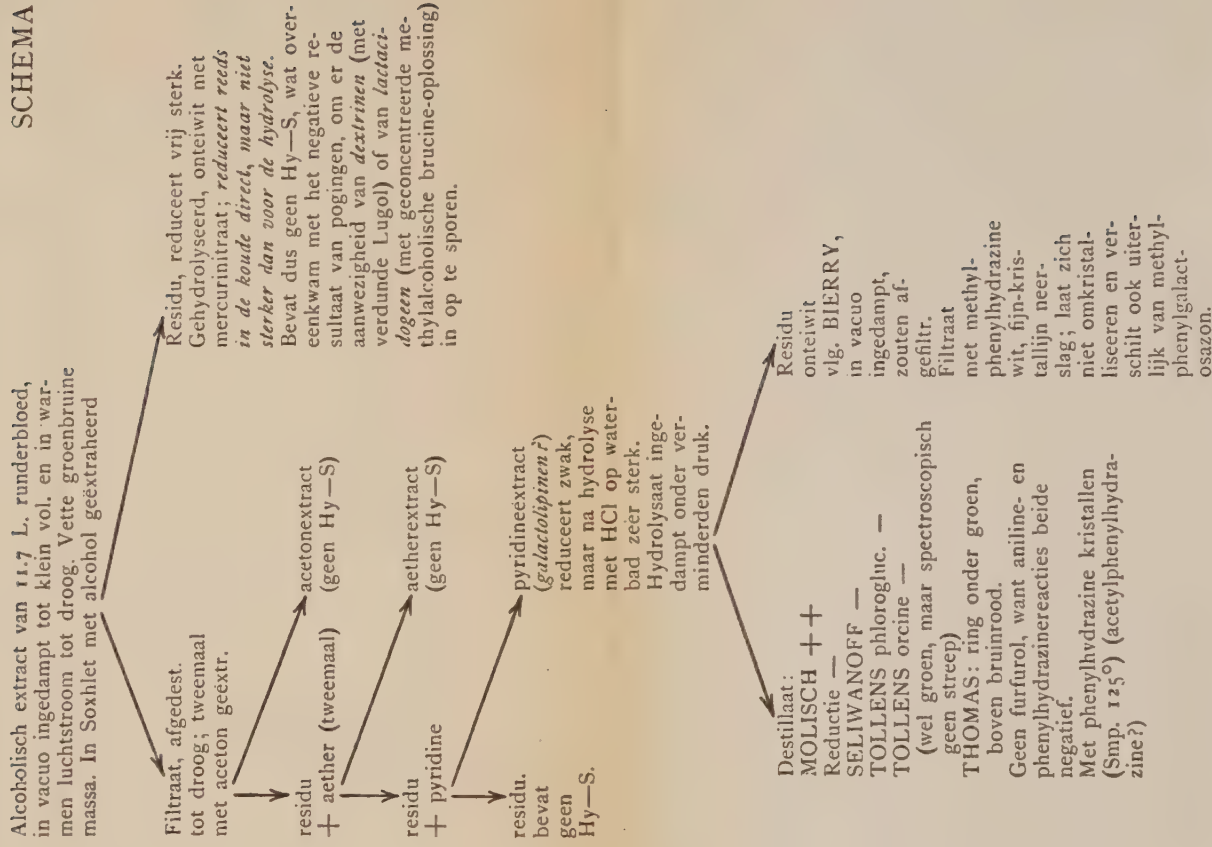
Stroop reduceert vrij sterk, oxyduul bruinpaars.

MOLISCH.....	zwak	+	+
Eiwitreacties		+	+
Tryptophaan		-	+
Gereduceerde zwavel.....		+	+
EHRLICH's diazo.....		+	+
Kreatinine (atypisch)		+	+
Urobiline, bilirubine		-	-
Indican		-	-

Met spoor FeCl₃ donkerbruinrood.
Met methyleenblauw snelle ontkleuring in zwak alkal. milieu onder toluol (glutathion +? nitroprussiedreactie —!

Donkere kleverige massa, die, opgelost in verdund zuur en van kwik bevrijd, het FOLIN — WU-reagens *reeds in de koude reduceert*. Kleur van de bijna kleurlooze oplossing slaat bij neutraliseeren in bruinrood om.

SCHEMA VII.



TABEL A.

No	GEWICHT		Geslacht	Voedingstoestand	Klin. toestand	TEMPERATUUR			% ₀₀ TOTALE LEVER-SUIKER			% ₀₀ VRIJE LEVER-SUIKER			% ₀₀ GLYCOGEEN			% ₀₀ GEBONDEN LEVER-SUIKER			% ₀₀ BLOEDSUIKER			INGESPOTEN MET (1 E. Insuline = $\frac{1}{5}$ krampdosis!)	GEBRUIKT GR. LEVER				LEVERREST Gr.	TOESTAND PROEFDIER bij einde proef
	bij oper.	bij proef				begin	na 2 u	na 4 u	begin	na 2 u	na 4 u	begin	na 2 u	na 4 u	begin	na 2 u	na 4 u	begin	na 2 u	na 4 u	begin	na 2 u	na 4 u		1e	2e	3e	Totaal		
44	2750	2300	♀	4 dagen vastend	zeer goed	39.1	39.6	38.6	7.25	11.—	7.78	1.49	1.84	2.16	0.25	0.38	0.23	5.51	8.78	5.39	1.00	1.75	1.86	2.3 cc $\frac{N}{100}$ HCl. subcut.	7.81	7.09	12.71	27.61	45.—	In goede conditie doodgeslagen.
45	3400	2750	♀	" " "	" "	39.1	39.9	39.6	10.05	10.70	9.66	0.95	2.71	1.89	0.42	0.57	0.59	8.68	7.42	7.18	1.26	1.21	1.59	2.5 cc " " intraveneus.	10.03	5.59	14.10	29.72	58.—	" " " "
46	2100	1820	♀	4 dagen vastend	vrij goed	38.1	37.8	—	23.61	8.15	—	1.40	0.50	—	2.20	0.90	—	20.01	6.75	—	1.29	2.06	—	1.8 cc = $\frac{1.8}{10}$ E. Insuline 331 intraven.	6.42	20.32	—	26.74	42.—	Sterft tijdens proef.
47	2200	2100	♀	4 " "	zeer "	38.2	38.6	—	15.09	7.25	—	1.90	0.85	—	1.60	0.53	—	11.59	5.87	—	1.25	1.41	—	2.1 cc = $\frac{2.1}{10}$ " " 331 "	6.83	11.03	—	17.86	40.—	" " "
48	2620	2150	♀	4 " "	"	38.1	38.1	33.5	10.59	11.79	2.97	1.20	1.85	0.70	1.20	0.65	0.10	8.19	9.29	2.17	1.23	1.36	0.63	2.15 cc = $\frac{2.15}{10}$ " " 331 "	8.51	8.01	—	16.52	39.—	" " "
49	2500	2370	♀	4 " "	zeer "	38.2	38.2	36.3	21.55	18.48	9.97	1.15	2.10	1.80	0.75	0.70	0.10	19.65	15.68	8.07	1.18	1.25	2.02	2.37 cc = $\frac{2.37}{10}$ " " 331 "	7.74	6.32	—	14.06	63.—	In slechte conditie doodgeslagen.
50	3050	2600	♀	4 " "	" "	38.4	37.5	35.1	14.40	12.64	6.06	2.30	1.75	1.00	11.20	11.70	1.55	0.90	0.00	3.51	?	1.32	2.12	2.6 cc = $\frac{2.60}{10}$ " " 331 "	10.00	7.12	11.90	29.02	36.—	" matig goede conditie doodgeslagen.
51	2350	2050	♀	4 " "	" "	38.3	38.1	33.9	9.14	9.26	3.61	1.65	1.70	0.62	1.40	3.25	0.90	6.09	4.31	2.09	1.18	0.42	0.65	$\frac{1}{3}$ cc = 1 Kr. d = 3 E. " 331 "	6.63	6.63	12.17	25.43	46.—	In krampen gestorven.
54	3200	2750	♀	4 " "	uitstekend	39.2	38.5	38.—	13.79	21.15	7.92	1.90	3.20	2.70	0.85	0.60	0.35	11.04	17.35	4.87	1.21	0.92	0.71	$\frac{1}{3}$ cc = 1 Kr. d = 3 " " 331 "	8.66	8.27	15.46	32.39	68.—	In uitstekende conditie doodgeslagen.
58	3050	2650	♂	4 " "	"	38.—	37.3	37.5	13.93	19.05	15.42	2.60	1.75	2.45	1.95	3.80	3.20	9.38	13.50	9.77	1.27	0.46	0.91	1 cc = 3 Kr. d = 9 " " 331 "	4.50	6.54	12.61	23.65	?	" vrij goede " "
59	3150	2820	♂	4 " "	"	38.6	37.6	37.8	20.50	16.45	13.05	2.75	2.10	2.35	6.35	5.00	3.85	11.40	9.35	6.85	1.41	0.38	0.48	1 cc = 3 Kr. d = 9 " " 331 "	4.96	6.49	8.72	20.17	?	" " " " "
60	2940	2450	♀	4 dagen vastend	goed	38.7	38.7	37.8	11.75	18.87	6.49	4.60	4.75	4.60	1.55	3.20	1.10	5.60	10.92	0.79	1.41	1.44	3.10	Nihil	5.52	4.91	15.40	25.83	52.—	In goede conditie doodgeslagen.
61	2650	2150	♀	4 " "	"	38.4	38.5	38.4	11.75	13.70	14.37	2.50	3.15	2.50	1.80	1.20	1.00	7.45	9.35	10.87	1.17	1.36	1.73	"	4.74	5.72	10.18	20.64	53.—	" zeer goede conditie, acute verbloeding.
62	2650	2320	♀	4 " "	zeer "	39.—	39.—	38.3	9.41	8.63	11.68	1.85	1.55	2.90	0.40	0.50	0.45	7.16	6.58	8.33	1.25	1.57	2.00	"	6.57	6.06	13.83	26.46	40.—	" " " " doodgeslagen.
63	2820	2350	♂	4 " "	"	38.9	39.1	38.9	12.52	15.93	15.75	2.75	4.30	4.20	2.00	2.00	1.10	7.77	9.63	10.45	1.20	1.22	1.48	"	6.07	4.90	6.63	17.60	47.—	" " " " "
64	2700	?	♂	4 " "	"	38.7	37.5	35.8	9.01	7.64	5.71	2.90	3.05	2.05	5.40	2.05	1.25	0.71	2.54	2.41	1.10	2.82	2.05	"	6.41	5.49	10.36	22.26	57.—	" matige " "

DRUK DE BUSSY, AMSTERDAM